



Labinfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

- 4 Tests Trichinella et contrôle de la qualité en Belgique
- 7 Détermination de la viabilité des nématodes à kystes de la pomme de terre (*Globodera rostochiensis* et *G. pallida*) au moyen de tréhalose
- 12 Compléments alimentaires à base de levure de riz rouge : vertus et risques pour la santé
- 15 Nouveau workflow pour la detection d'OGM non-autorisés en utilisant le Next-Generation-Sequencing
- 17 Étude des foyers d'origine alimentaire et typage moléculaire : diversité élevée de souches de *Staphylococcus aureus* et importance de la détection de toxine.
- 29 Workshops & Symposia



LabInfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

Equipe de rédaction

Luc Bollen, Dirk Courtheyn, Fanny Di Silvestro, Brigitte Pochet, Ely Harnie, Sandrine Léonard, Alain Dubois, Geert Janssens

Ont participé à ce numéro :

Bert Matthijs, Marleen Claes, Nicole Damme, Nicole Viane, Emmanuel Tangni, Marie-Alice Fraiture, Nina Papazova, Nancy Roosens, Sarah Denayer, Laurence Delbrassinne, Nadine Botteldoorn.

Traduction

Service de traduction de l'Agence

Equipe de rédaction

Photos et illustrations

Fournies par les laboratoires

Mise en page

Gert Van Kerckhove

Secrétariat de rédaction

LabInfo

p.a. L. Bollen

AFSCA

CA-Botanique – Food Safety Center

4ème étage, bureau K04/120220

Boulevard du Jardin botanique 55

1000 Bruxelles

Tel 02.211.87.34

luc.bollen@afsca-favv.be

Cher lecteur,

Plus de douze mois se sont déjà écoulés depuis la dernière édition de Labinfo. Comme vous avez pu le lire dans la presse cette période a été riche en événements pour l'Agence. En été, l'année passée, nous avons eu la crise du fipronil, ce début d'année, l'affaire Veviba, ... Ces incidents ont quelque peu perturbé notre travail quotidien. Mais pendant cette période, assez critique pour l'Agence, nous avons pu compter sur le support et la collaboration de certains LNR et de certains laboratoires privés. Je désire vivement remercier toutes les parties concernées pour leur soutien.

Entre temps, notre rédacteur, Dirk Courtheyn, a méritoirement pris sa pension fin 2017. Après un passage par le laboratoire de Gentbrugge, dont il a été, entre autres, le directeur, Dirk a rejoint l'Administration centrale de la DG des laboratoires. Parmi ses nombreuses tâches, Dirk s'est vu attribuer la responsabilité de l'édition de Labinfo, dont il a assumé la rédaction du 1^{er} numéro en octobre 2008 jusqu'au numéro 16 paru en avril 2017. Je l'en remercie et lui souhaite beaucoup de bonheur dans cette nouvelle phase de sa vie.

Vous savez également que notre gouvernement a pris des mesures pour diminuer la dette publique et par conséquent demande à l'administration fédérale de faire des efforts pour réduire son budget de fonctionnement et ses effectifs. Dans ce cadre nous avons dû prendre la décision de ne plus publier le Labinfo qu'une fois par an et uniquement en anglais. Ce numéro sera donc le dernier numéro édité en trois langues.

Le présent numéro aborde des sujets aussi divers que les tests Trichinella dans les laboratoires reconnus, la viabilité des nématodes à kyste dans les pommes de terre, le risque représenté par la citrine, une toxine pouvant être présente dans la levure de riz rouge, la détection des OGM non autorisés basée sur le Next - Generation - Sequencing et le point sur les toxi-infections alimentaires dues aux entérotoxines de *Staphylococcus aureus*.

Je vous souhaite beaucoup de plaisir à la lecture de cette dix-septième édition de Labinfo.

Bert Matthijs
Directeur général DG Laboratoires

Tests *Trichinella* et contrôle de la qualité en Belgique

Marleen Claes

*Laboratoire national de référence pour l'analyse des *Trichinella* (LNRT),
Institut de Médecine tropicale, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen*

Introduction

Trichinella spp. est un parasite présent sur l'ensemble du globe et susceptible de provoquer une infection en cas de consommation de viande contaminée insuffisamment cuite. Une infection par des larves de *Trichinella* peut entraîner de graves problèmes de santé chez l'homme.

C'est la raison pour laquelle, en Europe, les viandes de porc, de cheval et de sanglier destinées à la consommation humaine doivent obligatoirement être soumises à une analyse avant d'être commercialisées.

Un laboratoire de référence a été institué au niveau de l'Union européenne (EURL) et chaque État membre est dans l'obligation de prévoir un laboratoire national de référence (LNR).

Par le biais de l'organisation de workshops annuels, l'EURL a créé un vrai réseau de LNR européens. Ces workshops sont l'occasion de travailler ensemble à l'organisation de formations et d'essais interlaboratoires, et de discuter de l'approche à mener concernant certaines matières, telles que les exigences minimales d'échantillonnage, les contrôles de laboratoire, les directives applicables aux essais interlaboratoires, les exigences minimales en vue d'un laboratoire de qualité.

Évolution en Belgique

Formation :

En 1999, quatre journées d'étude facultatives ont pour la première fois été organisées, suivies en 2000 d'une après-midi d'étude ayant rassemblé 31 laboratoires participants. Une nouvelle après-midi d'étude a été organisée en 2006, à laquelle 12 laboratoires ont participé.

Depuis 2007, un « Groupe de communication » est organisé sur base annuelle, s'agissant d'une réunion organisée par le LNR en collaboration avec l'AFSCA et à laquelle chaque laboratoire agréé a l'obligation de participer. La communication est stimulée dans les deux sens. C'est là un moment idéal pour poser des questions, fournir des explications supplémentaires et présenter les nouveautés.

Essais interlaboratoires :

Des essais interlaboratoires sont organisés depuis 2007, auxquels la participation générale est obligatoire. Dans un premier temps, des échantillons congelés étaient utilisés pour désactiver les parasites et pour exclure tout risque d'infection et toute introduction potentielle du parasite dans l'environnement. Depuis 2011, des échantillons réfrigérés sont employés, auxquels un nombre prédéfini de larves vivantes a été ajouté. De plus, au fil des années, les critères sont progressivement devenus plus stricts et le nombre de larves ajoutées a été réduit.

Les laboratoires non accrédités participaient deux fois par an à ces tests circulaires, et les laboratoires accrédités une fois par an. Les mauvais résultats faisaient l'objet d'un suivi par l'AFSCA.

À l'heure actuelle, chaque laboratoire prend encore part à ces tests une fois par an, mais les laboratoires accrédités reçoivent un seul paquet d'échantillons tandis que les laboratoires non accrédités reçoivent un paquet d'échantillons pour chaque laborantin chargé d'exécuter le test.

Formation pratique :

En 2008, une formation intensive supplémentaire a été dispensée à chaque laborantin n'ayant pas obtenu de bons résultats à l'essai interlaboratoire de 2007 (le premier test circulaire général), suivi par deux envois supplémentaires de matériel d'échantillonnage. Depuis 2008, une formation pratique est organisée au LNR, à la demande des laboratoires. Ces formations pratiques sont, depuis 2014, regroupées en quatre formations par an. Chaque nouveau membre du personnel doit avoir suivi cette formation avant de pouvoir travailler en toute autonomie. La formation porte notamment sur les exigences relatives au matériel et aux réactifs et sur les points de contrôle critiques (CCP), et se compose d'une démonstration et d'exercices pratiques réalisés sur de la viande contaminée. Par ailleurs, un CD-rom produit par le LNR et comportant une description des différentes étapes du test, ainsi que des larves de référence fixées sont fournis à chaque laboratoire.

Les visites consultatives aux laboratoires ont au fil du temps été remplacées par des visites de contrôle basées sur une check-list, ou par des visites réalisées dans le cadre des audits Belac à l'égard de la norme ISO17025.

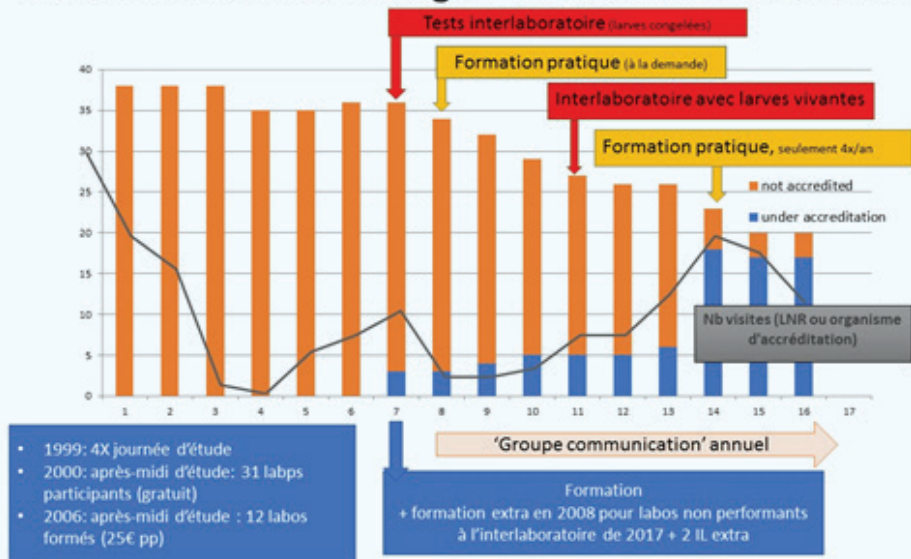
Conclusion :

Le nombre de laboratoires belges a connu une diminution mais la qualité des laboratoires restants a fortement augmenté. Ils travaillent avec un équipement de qualité, des réactifs adéquats et un personnel bien formé.

nrlt@itg.be



Nombre de labos belges *Trichinella* 2001-2016



nrlt@itg.be

Détermination de la viabilité des nématodes à kystes de la pomme de terre (*Globodera rostochiensis* et *G. pallida*) au moyen de tréhalose

Nicole Damme et Nicole Viaene

Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO)
Centre de diagnostic pour végétaux

Introduction

Les nématodes à kystes de la pomme de terre, *Globodera rostochiensis* et *G. pallida*, constituent une menace sérieuse pour la culture des pommes de terre et sont des organismes de quarantaine dans de nombreux pays, y compris en Belgique. Encapsulé dans un kyste, en réalité le corps enkysté de la femelle, le nématode peut survivre des années dans le sol. Le kyste contient de petits œufs, en moyenne environ 250 pour les nouveaux kystes, desquels peuvent éclore des juvéniles. Ces kystes peuvent rester viables plusieurs années, même en l'absence d'une plante hôte adéquate. Chez nous, cette plante hôte est principalement la pomme de terre. Connaître la viabilité des nématodes à kystes de la pomme de terre est important étant donné que les kystes vides ou contenant des œufs morts peuvent encore être retrouvés des années dans le sol vu que le kyste (l'enveloppe) se rompt très lentement. De tels kystes non viables ne constituent cependant pas une menace pour le plant de pomme de terre.

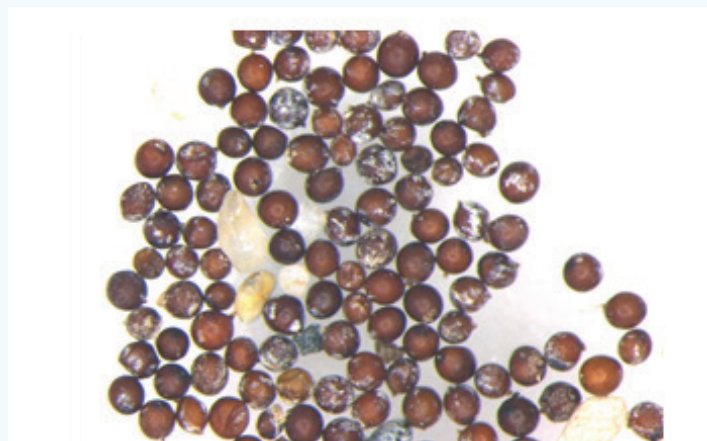


Figure 1 : Kystes et matériel inerte comparable après extraction du sol



La viabilité des kystes est surtout très importante pour la culture des pommes de terre car la législation impose que ces parcelles soient indemnes kystes des pommes de terre viables. Préalablement à la culture, toutes les parcelles destinées aux plants sont examinées par l'AFSCA quant à la présence de kystes des pommes de terre au moyen du prélèvement d'un échantillon de terre. Lorsque des kystes de la pomme de terre sont découverts dans l'échantillon, l'ILVO détermine s'ils sont encore viables.

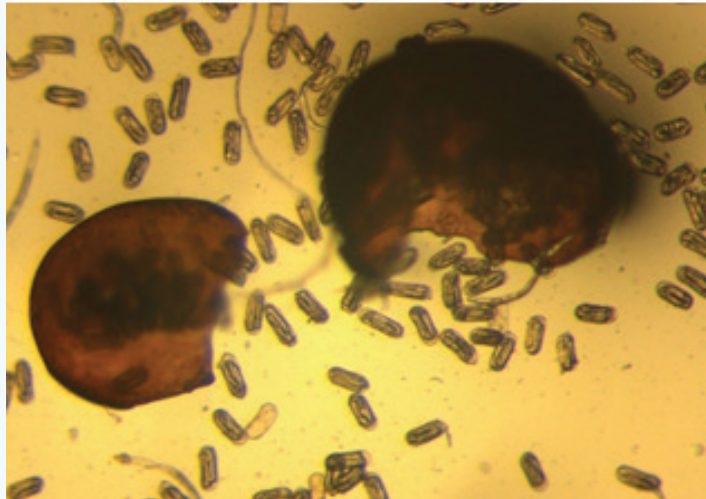


Figure 2 : Kyste ouvert avec des œufs et quelques juvéniles

Jusqu'à présent, la viabilité des kystes de la pomme de terre est déterminée au Centre de diagnostic pour végétaux (ILVO) au moyen du test d'éclosion lors duquel on vérifie si les juvéniles sortent des œufs et sont donc viables. Cela se fait en plaçant les kystes dans l'exsudat de racine de pommes de terre, le stimulant naturel pour l'éclosion de ces nématodes. Cet exsudat incite les juvéniles à sortir des œufs ; le test d'éclosion est parfois aussi appelé test d'appât. Cette technique est très fiable pour les kystes ayant déjà passé une période froide (l'hiver) mais a pour inconvénient que l'éclosion ne se fait pas immédiatement et peut durer plusieurs semaines. Afin de limiter le temps de rotation du test, le suivi n'est actuellement assuré « que » jusqu'à 3 semaines pour voir si les juvéniles sortent des kystes. Si ce n'est pas le cas, les kystes sont écrasés afin de rendre les œufs visibles et on évalue visuellement s'ils sont vivants ou non. Ce test visuel peut toutefois être subjectif, surtout lorsque la distinction entre vivant et mort n'est pas si évidente. Il est possible que des juvéniles viables n'éclosent pas en raison du fait qu'ils n'ont pas encore passé de période froide (kystes à peine formés, échantillonnage directement après la culture de pommes de terre) ou simplement parce qu'ils sont lents et ont besoin de plus de 3 semaines pour éclore. Dans ces cas, l'évaluation visuelle est le seul test de viabilité.

Viabilité sur la base de tréhalose

Principe

Au cœur de l'œuf, le stade juvénile peut survivre des années dans un état de déshydratation partielle car il est entouré de liquide périvitellin contenant du tréhalose. Le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) est un disaccharide très stable qui préserve l'intégrité de la membrane en cas de déshydratation. Lorsque le juvénile meurt au sein de l'œuf, la membrane cellulaire perd sa perméabilité sélective, ce qui entraîne la diffusion de tréhalose depuis l'œuf et la perte de ce disaccharide. Par conséquent, la présence de tréhalose dans l'œuf est une indication d'œufs vivants. En déterminant la présence de tréhalose dans les petits œufs des kystes, on peut donc dire si le kyste est encore vivant.

Méthode

Afin de vérifier si un ou plusieurs kystes contiennent encore des œufs viables, ils sont prudemment écrasés dans un tube (type Eppendorf) afin de libérer les petits œufs. La détermination de la concentration en tréhalose se fait indirectement. L'enzyme tréhalase est d'abord ajoutée afin qu'apparaissent 2 unités de D-glucose par l'hydrolyse de tréhalose. Le D-glucose est ensuite phosphorylé, en présence d'hexokinase et d'ATP, en glucose-6-phosphate. Ce dernier est oxydé en gluconate-6-phosphate et NADPH par la glucose-6-phosphate déhydrogénase et NADP⁺. La concentration de ce NADPH est alors mesurée par spectrophométrie (Nano-Drop) à une longueur d'onde de 340 nm. Si cette quantité dépasse une certaine valeur seuil, cela indique que du tréhalose était présent et que les kystes étaient donc viables. La valeur seuil correspond à 20 petits œufs, cela signifie que des nombres d'œufs inférieurs ne sont pas toujours détectés. Le test a initialement été développé aux Pays-Bas (van den Elsen et al., 2012) et a ensuite été mis au point dans le cadre d'une thèse de doctorat ILVO sur la survie des kystes des pommes de terre (Ebrahimi et al., 2015). Le test est également repris dans le Protocole de diagnostic EPPO pour Globodera (OEPP, EPPO 2015).

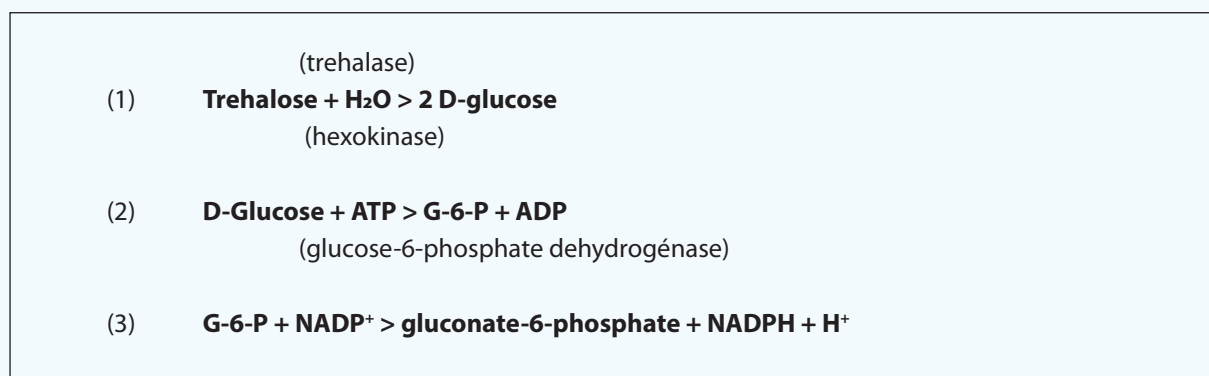


Figure 3 : Schéma des réactions enzymatiques lors de la détermination de la présence de tréhalose, ce qui indique que des œufs sont vivants.



Il faut toutefois veiller à ce qu'il ne s'agisse pas d'un échantillon d'un terrain récemment assaini car la dissolution de tréhalose dans les œufs morts n'est pas encore entièrement effectuée, ce qui peut entraîner des résultats faux positifs (œufs morts désignés comme vivants).

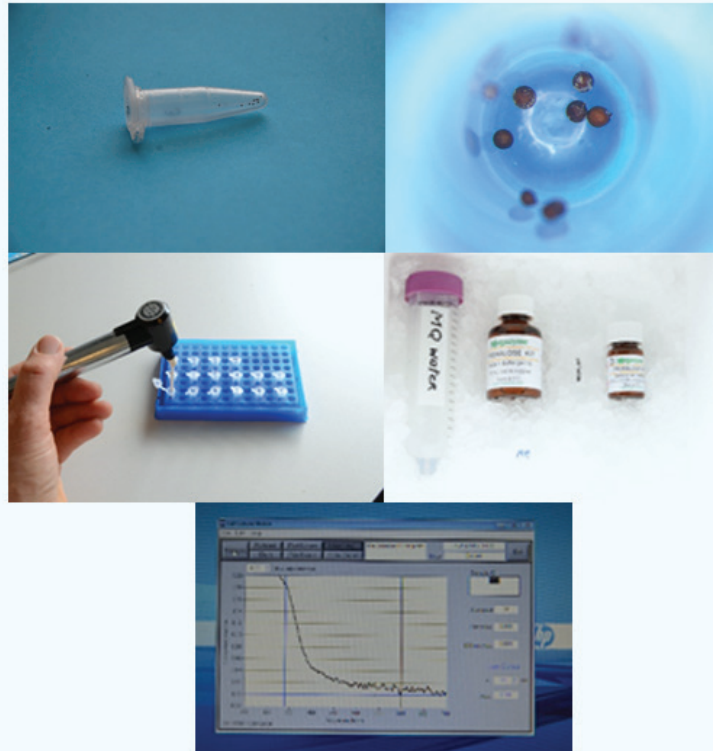


Figure 4 : Kystes dans tube Eppendorf (vue latérale et vue d'en haut), écrasement des kystes, produits à ajouter (sur glace), lecture des résultats du spectrophotomètre.

Test tréhalose versus test d'éclosion

Le test tréhalose indique rapidement s'il y a encore de la vie dans les kystes de pommes de terre : l'analyse peut être clôturée en une journée. Le test d'éclosion peut durer 3 semaines et la détermination visuelle peut, dans certains cas, être subjective, surtout dans le cas où des œufs sont considérés comme morts. Face à cela, le test tréhalose est moins sensible que le test d'éclosion : avec le test tréhalose, il se peut que des œufs viables ne soient pas toujours détectés si leur nombre est inférieur à 20 tandis que lors du test d'éclosion, nous voyons les juvéniles vivants et il y a donc détection à partir d'1 nématode vivant. Une limite de détection de « seulement » 20 œufs vivants par échantillon de terre, qui dans la plupart des cas représente un hectare, peut toutefois être acceptable si, en contrepartie, les résultats du test sont très rapidement connus. Un point faible du test tréhalose est sa moindre fiabilité pour les kystes provenant de terrain récemment assaini (possibilité de résultats faux positifs). Le prix est également un peu plus élevé : le test tréhalose coûte 90 euros tandis que le test d'appât en coûte 70.

Références

- Beniers, J.E. et al. 2014. Quantification of viable eggs of the potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) using either trehalose or RNA-specific Real-Time PCR. *Nematology*, 1219-1232.
- Ebrahimi, N. et al. 2015. Optimizing Trehalose-Based Quantification of Live Eggs in Potato Cyst Nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*). *Plant Disease*, 947-953.
- OEPP/EPPO (2013) EPPO Standard PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 43, 119–138.
- van den Elsen, S. et al. 2012. A rapid, sensitive and cost-efficient assay to estimate viability of potato cyst nematodes. *Phytopathology* 102, 140-146

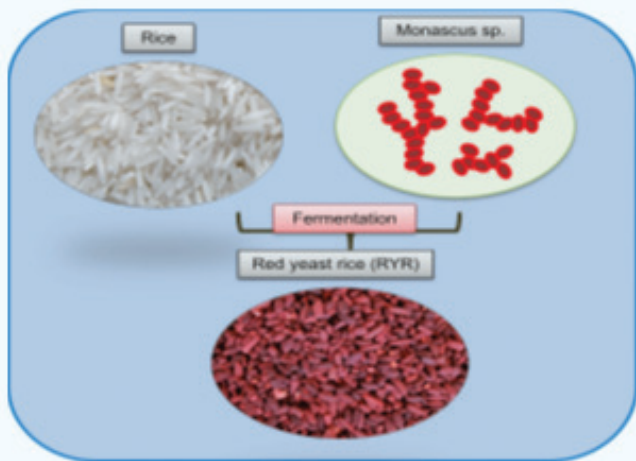


Compléments alimentaires à base de levure de riz rouge : vertus et risques pour la santé

Tangni Emmanuel K. (emmanuel.tangni@coda-cerva.be)

Centre d'Étude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CODA-CERVA)
Direction Opérationnelle Sécurité Chimique de la Chaîne Alimentaire,
Service Toxines et Substances Naturelles,
Laboratoire National de référence Mycotoxines, Toxines de plante et Toxines marines
Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, Belgique

La levure de riz rouge provient de la fermentation solide de riz (*Oryzae* sp.) inoculé avec une moisissure (*Monascus purpureus*) afin de produire des composés capables d'inhiber la production de cholestérol et de maintenir un taux de cholestérol sain. Certains pays d'Asie l'utilisent comme complément alimentaire naturel depuis des millénaires, et elle est aujourd'hui acceptée comme telle dans le monde entier. La levure de riz rouge peut être vendue seule sous forme de poudre destinée à être prise en unités mesurées de faible quantité, ou comme complément alimentaire commercialisé sous forme de doses telles que les gélules, comprimés ou pilules. Ces compléments alimentaires se vendent soit dans les commerces de détail (pharmacies, drogueries), soit sur Internet.



Outre l'amidon de riz et le sucre, la levure de riz rouge est un conglomérat de composés bioactifs, incluant notamment des polycétides (monacoline K, similaire à la lovastatine), des phytostérols, des acides gras insaturés, des pigments (monascorubrine, rubropunctatine, ankaflavine, rubropunctamine, monascorubramine, monascine) et des tannins condensés.

La levure de riz rouge favorise la digestion et la circulation sanguine. Son utilisation est préconisée car elle contribue à la santé publique en réduisant le risque de maladies cardiaques chez les personnes ayant un taux de cholestérol modérément élevé. Outre sa propriété principale antilipémique, des propriétés amélioratives anticancéreuses, antiglycémiques et ostéoprotectrices lui ont été attribuées et justifient des recherches supplémentaires. Pour en tirer des avantages médicaux constants et obtenir une vision globale, il est nécessaire de réaliser des études épidémiologiques complémentaires.

La levure de riz rouge est également utilisée pour améliorer les propriétés organoleptiques (ex. la couleur) de la viande. En plus d'être utilisée comme colorant rouge, elle sert aussi de conservateur et d'aromatisant.



Outre le composé hypocholestérolémiant classique, la fermentation de la levure de riz rouge entraîne souvent la production d'une toxine naturelle appelée « citrinine », qui peut contribuer de manière significative à la biodisponibilité de cette mycotoxine dans le tube digestif. La citrinine est une substance néphrotoxique. Sur base des données disponibles, elle est considérée comme génotoxique et cancérigène. Les preuves attestant de la contamination globale de la levure de riz rouge par la citrinine sont accablantes. Les compléments alimentaires disponibles sur le marché, tels que la levure de riz rouge en gélules, ont révélé des concentrations de citrinine allant de 2 à 114 µg/capsule. En Belgique, de faibles concentrations de citrinine ont souvent été observées dans des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge. Des concentrations élevées de citrinine (jusqu'à 121 mg/kg) ont occasionnellement été découvertes dans des échantillons de levure de riz rouge en provenance de l'étranger (valeurs dépassant la limite légale de 2000 µg/kg, Règlement UE n° 212/2014 de la Commission). Les informations scientifiques les plus récentes évaluées par la European Food safety Authority (EFSA) identifient clairement la levure de riz rouge comme le produit le plus fréquemment contaminé par la citrinine. Parmi les 37 échantillons analysés, la citrinine a été quantifiée dans 24 compléments alimentaires à base de levure de riz rouge, et ce dans des concentrations allant de 10 à 3 597 µg/kg. Seuls 13 échantillons contenaient des niveaux de traces inférieurs à la limite de quantification (10 µg/kg). Bien que l'étiquette mentionnait que les échantillons provenaient d'Europe, on ne sait pas exactement si



la matière première était originaire d'Europe ou si elle y avait été transformée. Il a été noté que dans 3 échantillons, la teneur en citrinine dépassait la limite légale européenne. C'est pourquoi l'EFSA a exigé le suivi de la levure de riz rouge et des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge quant à la gestion des risques pour la santé humaine. Suite à cela, l'EFSA a jugé nécessaire et approprié de revoir la teneur maximale actuellement fixée à 2000 µg/kg dans les compléments alimentaires à base de levure de riz rouge. Le European Standardization Committee (CEN) a lancé un mandat via CEN/TC275 WG5 en vue de la standardisation de la méthode analytique pour déterminer la concentration de citrinine dans les denrées alimentaires, ce qui permettra à l'avenir de recueillir des données pour évaluer l'exposition des consommateurs.

Le dosage de la monacoline, la teneur en citrinine et l'interaction avec d'autres médicaments constituent des facteurs critiques pour l'efficacité thérapeutique de la levure de riz rouge et des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge.

Lectures complémentaires :

- Règlement (UE) n° 212/2014 de la Commission modifiant le Règlement (CE) n° 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en contaminant citrinine dans les compléments alimentaires à base de riz fermenté avec de la levure rouge *Monascus purpureus*. Journal officiel de l'Union européenne L 67: 3-4.
- EFSA European Food Safety Authority 2012. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA J. 10(3):2605.
- Kiebooms JAL, Huybrechts B, Thiry C, Tangni EK, Callebaut A (2016) A quantitative ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for citrinin and ochratoxin A detection in food, feed and red yeast rice food supplements. World Journal Mycotoxin 9(3):343-352.

emmanuel.tangni@coda-cerva.be

Nouveau workflow pour la détection d'OGM non-autorisés en utilisant le Next-Generation-Sequencing

Marie-Alice Fraiture (Marie-Alice.Fraiture@wiv-isp.be)

Nina Papazova (Nina.Papazova@wiv-isp.be)

Nancy H Roosens (nancy.roosens@wiv-isp.be)

Plateforme Biotechnologie et Biologie Moléculaire, Institut Scientifique de santé Publique, rue J. Wytsman 14, 1050 Bruxelles, Belgique

Le système actuel de détection des organismes génétiquement modifiés (OGM) employé par les laboratoires de contrôle est basé sur la technologie qPCR. Tout d'abord, la présence potentielle d'OGM est investiguée par une analyse de criblage qPCR ciblant principalement les éléments communément trouvés dans les constructions transgéniques d'OGM. La combinaison de p35S (promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)) et de tNOS (terminateur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*) couvre la plupart des OGM autorisés en Europe ainsi que des OGM non autorisés en Europe. Par conséquent, un OGM non autorisé peut échapper à ce système de contrôle si les échantillons testés contiennent à la fois des OGM autorisés et non autorisés. De plus, étant donné que la plupart des marqueurs de criblage utilisés sont dérivés d'organismes naturels, tels que p35S et tNOS, leur détection ne peut que permettre de suspecter la présence d'OGM.

Pour surmonter ces difficultés, nous avons récemment proposé un nouveau workflow basé sur le next-generation-sequencing (NGS) afin d'obtenir les informations de séquences nécessaires pour prouver la présence d'OGM non autorisés dans la chaîne alimentaire. Plus précisément, l'analyse de criblage qPCR, ciblant des éléments transgéniques clefs fréquemment présents dans les OGM autorisés et non autorisés, comme p35S, tNOS et t35S pCAMBIA, est toujours utilisée comme première étape pour cibler un large spectre d'OGM. Si l'un de ces éléments transgéniques est détecté au cours de l'analyse de criblage qPCR, une seconde étape est ensuite appliquée pour obtenir des informations sur les séquences entourant cet élément transgénique. Plus précisément, une stratégie de DNA walking ancrée sur les éléments transgéniques précédemment détectés est appliquée afin d'amplifier les séquences inconnues avoisinantes. Le produit final de la PCR peut ensuite être séquencé grâce aux technologies NGS. Ce workflow a été appliqué avec succès sur des échantillons d'OGM, dont des OGM à l'état de traces, des mélanges d'OGM et des matrices alimentaires transformées. Parmi les différentes plateformes NGS, l'utilisation des instruments de Pacific Biosciences® et Oxford Nanopore® pour le séquençage de ces bibliothèques d'ADN enrichies avec des séquences d'intérêt a été évaluée comme étant les options les plus pertinentes puisqu'elles sont capables de traiter des bibliothèques hétérogènes et fournissent actuellement le plus long « read-length » (jusqu'à 60 kpb et 200 kpb respectivement pour la technologie Pacific Biosciences® et la technologies Oxford Nanopore®).

De cette manière, la complexité de l'analyse bioinformatique peut être réduite car les séquences entières des amplicons générés peuvent être directement collectées sans assemblage de novo préliminaire de courtes séquences pour reconstruire des séquences plus longues. Les séquences d'ADN générées à partir de cette stratégie ciblées par NGS peuvent d'abord être comparées à une base de données contenant au moins toutes les séquences des OGM autorisés en Europe, comprenant les cassettes transgéniques, les génomes de plantes et les jonctions entre le génome de l'hôte et la cassette transgénique. Si aucune correspondance ne peut être établie entre les séquences générées et les séquences d'OGM autorisés, la présence d'OGM non autorisés est prouvée après confirmation par PCR.



Avec ce nouveau workflow, contrairement au système actuel de détection des OGM, la présence d'OGM non autorisés ne peut pas être masquée par la présence d'OGM autorisés. En ce qui concerne l'étape de séquençage, la technologie NGS peut facilement et considérablement augmenter le nombre d'échantillons dans une analyse via un système de barcodes, permettant ainsi de surveiller la présence d'OGM non autorisés dans la chaîne alimentaire de manière rapide et haut-débits.

Remerciement

Cette recherche a été financée par le Service Public Fédéral de la Santé publique, la Sécurité de la Chaîne alimentaire et de l'Environnement (convention RF 11/6242) à travers le projet UGMMONITOR.

Référence

Fraiture Marie-Alice, Herman Philippe, De Loose Marc, Debode Frédéric and Roosens Nancy (2017) How can we better detect unauthorized GMO in the food and feed chain. Trends in Biotechnology. 35:507-517.doi: 10.1016/j.tibtech.2017.03.002

Étude des foyers d'origine alimentaire et typage moléculaire : diversité élevée de souches de *Staphylococcus aureus* et importance de la détection de toxine

Sarah Denayer, Laurence Delbrassinne et Nadine Botteldoorn.

Institut scientifique de Santé publique (ISP-WIV), LNR Intoxications alimentaires-LNR Staphylocoques à coagulase positive, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Bruxelles, Belgique.

Introduction

Les intoxications alimentaires provoquées par des entérotoxines staphylococciques (SE) font partie des foyers liés à l'alimentation les plus rapportés. Elles sont provoquées par la consommation d'une denrée alimentaire dans laquelle des staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement *Staphylococcus aureus*, peuvent se développer et produire des entérotoxines. Des données de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) démontrent que les toxines bactériennes sont la deuxième cause la plus rapportée d'intoxications alimentaires en Union européenne et ce pour la période de 2011-2015 (EFSA 2012-2016). Au cours de cette période, des toxines bactériennes étaient responsables de 12,9% à 19,5% des foyers d'origine alimentaire, dont environ la moitié causés par des SE.

Une intoxication par SE est caractérisée par la manifestation rapide de symptômes typiques dont des vomissements, nausées, crampes d'estomac et dans certains cas aussi, de la diarrhée. La période d'incubation typique est de 2 à 7 heures mais parfois, des symptômes sont déjà rapportés 30 minutes après la consommation d'une denrée alimentaire contenant des SE (Humphries en Linscott, 2015). Les symptômes se guérissent de par eux-mêmes et disparaissent généralement dans les 12 heures. La gravité des symptômes dépend de la quantité de toxine ingérée, de l'état de santé de l'individu mais également du type de toxine (Hennekinne et al., 2012). Pour les personnes sensibles, comme le groupe des YOPI (jeunes, personnes âgées, femmes enceintes, personnes immunodéprimées), une hospitalisation peut être nécessaire.

Jusqu'à présent, 24 SE différentes ont été décrites sur la base de leur antigénicité (Hennekinne et al., 2012; Ono et al., 2015). La nomenclature des SE (SEA à SEIY) est basée sur la chronologie de leur découverte. Pour un sous-groupe de SE, une activité émétique a déjà pu être démontrée (Argudin et al., 2010, Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015). Il est fait référence aux autres comme à des toxines de type SE (SEI) parce qu'elles ne présentent pas d'activité émétique ou que celle-ci n'a pas encore pu être établie. Parmi les 24 SE décrites dans la littérature, seules 5 SE sont caractérisées de manière détaillée (SEA, SEB, SEC, SED et SEE), des méthodes de détection (commerciales ou internes) étant déjà disponibles pour ces dernières (Nia et al., 2016 ULPT, NIA et al., 2016 Equatox). La présence de ces toxines est généralement décrite de manière qualitative dans le cadre de foyers, des données quantitatives sur les SE dans les denrées alimentaires étant quant à elles plutôt rares. De récentes découvertes indiquent que d'autres SE (SEG, SEH, SEI, SER, SES et SET) représentent également un risque potentiel d'intoxications alimentaires (Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015). En raison de leur stabilité à des températures élevées (jusqu'à 28 minutes à 121°C), les SE ne sont pas en-



tièrement détruites lors du traitement par la chaleur qui est actuellement appliqué dans la transformation alimentaire (comme 15 s à 72°C) (Hennekinne et al., 2012, Balaban en Rasooly 2000). De plus, les SE résistent à de nombreuses conditions environnementales (faible pH, surgélation, séchage) dans lesquelles les SCP ne survivent pas et elles résistent aux enzymes protéolytiques humaines, restant ainsi actives dans le système digestif après ingestion (Hennekinne et al., 2012). La dose toxique est généralement reprise pour des observations des SEA dont à peine 20-100 ng peuvent déjà provoquer des symptômes chez un adulte sensible (Hennekinne et al., 2012).

Une intoxication alimentaire par SE est principalement associée au traitement non correct de denrées alimentaires cuites ou transformées dont les conditions de conservation permettent ensuite le développement de SCP et donc également la production de SE (Argudin et al., 2010). Les personnes en charge de la préparation des aliments porteuses de SCP produisant des SE (par ex. au niveau du nez, des mains, de la peau) sont considérées comme la principale source de contamination alimentaire par contact manuel ou par sécrétions. *Staphylococcus aureus* est en effet une bactérie fréquemment rencontrée sur la peau et les muqueuses de l'homme, avec une persistance d'environ 20-30% (Kluytmans en Wertheim, 2005). D'autre part, des SCP peuvent également se retrouver dans la production de produits laitiers via du lait contaminé d'animaux (bétail, ovins, caprins) avec un pis infecté (Hennekinne et al., 2012; Kümmel et al., 2016).

Le développement de SCP est principalement favorisé dans les aliments riches en protéines comme les viandes et les produits à base de viandes, les volailles et ovoproduits, le lait et les produits laitiers ainsi que les produits de boulangerie (principalement la crème pâtissière) (EFSA report 2010 – 2015, Hennekinne et al., 2012). Le diagnostic d'une intoxication alimentaire par SCP se base généralement sur une quantité $>10^5$ ufc SCP/g et la détection de SE dans des restes alimentaires mais également sur l'isolation de clones de *S. aureus* identiques chez les patients et sur les restes alimentaires concernés (Hennekinne et al., 2010).

Trois foyers provoqués, en 2013, par des SCP producteurs de SE permettent de démontrer l'importance du type moléculaire des isolats de SCP provenant de l'homme et de l'alimentation mais également l'importance de la détection et de la quantification des SE dans les denrées alimentaires.

Méthodes

Pour les foyers d'origine alimentaire en Belgique, les inspecteurs de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) sont responsables de l'analyse de la partie alimentaire et de l'échantillonnage des denrées alimentaires tandis que les médecins de Diensten Infectieziektenbestrijding (Flandre) et AViQ-CO-COM (Wallonie et Bruxelles) sont responsables du volet humain de l'analyse avec la collecte d'échantillons humains. Les informations épidémiologiques sur le foyer sont obtenues via les (membres de la famille des) patients.

Le dénombrement de SCP et *Bacillus cereus* sur des échantillons alimentaires a été réalisé tel que décrit respectivement dans ISO 6888-1:1999 et ISO 7932:2004. Des fèces ou du vomi humain ont directement été transférés sur gélose MYP (*B. cereus*) et gélose Baird Parker (CPS). La détection de la présence de SE a été effectuée à l'aide du VIDAS, suivant la méthode de screening européenne (ESMv5), la quantification de SE dans l'alimentation a été réalisée au moyen d'une méthode ELISA quantitative au Laboratoire de référence de l'Union européenne pour SCP (Anses). Les isolats de SCP ont été caractérisés plus en détails pour la présence de 11 gènes d'entérotoxines par PCR (Roussel et al., 2015). La comparaison d'isolats humains et d'isolats alimentaires a été réalisée au moyen d'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) avec *SmaI* comme enzyme de restriction (Roussel et al., 2015).

Résultats

En 2013, quatre foyers d'origine alimentaire provoqués par des SCP ont été notifiés en Belgique. Trois d'entre eux sont décrits ici. Un cas humain a été défini comme une personne ayant pris un repas à l'endroit du foyer et ayant présenté des symptômes (vomissements) dans un laps de temps de 1 à 6 heures.

- Un foyer A s'est déclaré dans une maison de repos et a été rapporté par des médecins des « Diensten Infectieziektenbestrijding ». Vingt-huit résidents ont vomi dans les 3 heures ayant suivi le repas de midi. Le repas de midi se composait de pain de viande ou de cabillaud et de purée de pommes de terre.
- Un foyer B a été rapporté à l'AFSCA par le responsable d'une firme de catering après que 18 personnes aient vomi dans les 6 heures suivant la consommation de diverses denrées alimentaires lors d'un barbecue local. Le même traiteur avait également livré des aliments pour un barbecue similaire à un autre endroit mais aucun malade n'a été signalé à cet endroit. Une donnée intéressante était la panne de courant du camion frigorifique sur le site du foyer avec un éventuel impact sur la température de conservation.
- Foyer C : Dans ce cas, 6 des 7 enfants exposés ont vomi dans l'heure suivant la consommation de purée de carottes et de poisson. L'âge des enfants variait de 9 mois à 2 ans. Un petit enfant qui n'avait mangé qu'une petite quantité d'aliment (<2g) n'a pas été malade. Tous les enfants malades ont été hospitalisés et 2 enfants étaient en état de choc. La purée de carottes contenait également des restes de la veille, refroidis à température ambiante avant d'être conservés au réfrigérateur. Le poisson a été étuvé juste avant la consommation.

Les aliments ayant probablement provoqué les symptômes, dont également les restes alimentaires ont, s'ils étaient disponibles, été envoyés pour analyse. Étant donné que les symptômes (vomissements) pour ces foyers se sont manifestés peu de temps après la consommation des denrées alimentaires concernées, l'analyse laboratoire s'est concentrée sur les pathogènes alimentaires produisant des toxines émétiques, à savoir *Bacillus cereus* et les staphylocoques à coagulase positive. Des échantillons de fèces des malades et des écouvillons du nez et/ou de la gorge des personnes en charge de la préparation des aliments ont en outre été analysés quant à ces pathogènes.

Aucune toxine émétique produite par *Bacillus cereus* n'a été détectée dans aucun des échantillons. Des SCP ont été isolés pour les trois foyers, comme détaillé dans les tableaux 1 (foyer A), 2 (foyer B) et 3 (foyer C). La caractérisation des isolats sur les gènes d'entérotoxines présents a également été reprise dans les tableaux de même que la détection et/ou la quantification des entérotoxines présentes dans les restes alimentaires.



Tableau 1 : Aperçu des dénombrements de SCP dans des échantillons alimentaires, détection de SCP dans des échantillons d'origine humaine et résultats du typage d'isolats pour le foyer A.

Détection SE ^a								
	Origine (F, C, FH)*	Matrice	SCP (ufc/g, D, ND)	souche (type SE, ND)	Aliments (D, ND)	SE (ng/g) ^b	Gènes se	Pulsotype
Foyer A	F	Purée de pommes de terre	270	SEA, SED	D	SEA 0.019	<i>sea, sed, seg, sei, sej, ser</i>	210
	F	Divers (17 stalen)	ND		ND		Aucun isolat	
	C	Fèces 1	D	SEA			<i>sea, sed, seg, sei, sej, ser</i>	210
	C	Fèces 2	D	SEA			<i>sea, sed, seg, sei, sej, ser</i>	210
	FH ¹	Écouvillon de gorge	D	SEA			<i>sea, seh</i>	37
	FH ²	Écouvillon de gorge	D	SEC			<i>sec, seg, sei</i>	212
	FH ³	Écouvillon de la gorge / du nez	D	SEA			<i>sea, seh</i>	19
	FH ⁴	Écouvillon du nez	D	ND			Gènes se analysés avec résultat négatif	N/A
	FH ⁵	Écouvillon du	D	ND			<i>seg, seh, sei</i>	213
	FH ⁵	Écouvillon du	D	ND			<i>seg, seh, sei</i>	214
	FH ⁶	Écouvillon du	D	ND			<i>seg, sei</i>	211
	FH ⁷	Écouvillon de la gorge / du nez	D	ND			Gènes se analysés avec résultat négatif	N/A
20 FH/7 C	Écouvillon / Fèces	ND				Aucun isolat		

En ce qui concerne le foyer A, de faibles nombres de SCP (270 ufc/g) ont uniquement été retrouvés dans la purée de pommes de terre, les autres échantillons d'aliments étaient négatifs au SCP. De faibles quantités de SEA (0.019 ng/g) ont également été détectées dans cette matrice. Le SCP entérotoxigène a été isolé dans les selles de 2 patients. Des écouvillons du nez et de la gorge de 7 personnes en charge de la préparation des aliments étaient également positifs au SCP. Un profil de gènes se identique est observé entre l'isolat alimentaire et les isolats des 2 patients, tandis que d'autres profils ont été observés pour les isolats provenant des personnes en charge de la préparation des aliments.

Tableau 2 : Aperçu des dénombrements de SCP dans des échantillons alimentaires, détection de SCP dans des échantillons d'origine humaine et résultats du typage d'isolats pour le foyer B.

Détection SE ^a								
	Origine (F, C, FH)*	Matrice	SCP (ufc/g, D, ND)	souche (type SE, ND)	Aliments (D, ND)	SE (ng/g) ^b	Gènes se	Pulsotype
Foyer B	F	Poulet	1700	SEA, SEC	ND	N/A	sea, sec	195
	F	Saucisse	1300	SEA	D	N/A	sea	209
	F	Viande bovine	900	ND	ND	N/A	sea	209
	F	Salade de pommes de terre	7200000	SEA, SEC	D	SEA 0.015	sea, sec	195
	F	Tarte	100	ND	ND	N/A	sep	5
	F	Divers (11 échantillons)	ND		N/A		Aucun isolat	
	4 FH/ 5 C	Fèces (9 échantillons)	ND				Aucun isolat	

Des nombres élevés de SCP ont été détectés dans la salade de pommes de terre (>10⁶ ufc/g). Non seulement des SEA ont été détectés dans cette salade de pommes de terre mais elle contenait également des quantités élevées de SEC.

Dans les autres denrées alimentaires concernées, des nombres plus faibles (10²-10³ ufc/g) de SCP positifs à sea étaient présents, mais la toxine SEA n'a pas été détectée. Une transmission de souches de SCP producteurs de SEA, à d'autres denrées alimentaires, par une contamination croisée, lors de la conservation, ne peut pas être exclue, d'autre part, la concentration en SEA dans ces denrées alimentaires était probablement inférieure à la limite de détection de toutes les méthodes utilisées. Le SCP n'a été isolé pour aucun des échantillons humains.

Tableau 3 : Aperçu des dénombrements de SCP dans des échantillons alimentaires, détection de SCP dans des échantillons d'origine humaine et résultats du typage d'isolats pour le foyer C.

Détection SE ^a								
	Origine (F, C, FH)*	Matrice	SCP (ufc/g, D, ND)	souche (type SE, ND)	Aliments (D, ND)	SE (ng/g) ^b	Gènes se	Pulsotype
Foyer C	F	Purée de carottes avec poisson	>15000000	SEA	N/A		sea, seg, sei	208
	F	Poisson	ND		N/A		Aucun isolat	
	C	Fèces 1	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Fèces 2	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Fèces 3	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Fèces 4	D	SEA			sea, seg, sei	208
	FH	Écouvillon gorge/nez	D	SEA			sea, seg, sei	208
	C	Matières vomies	ND				Aucun isolat	

Dans la purée de carottes du foyer C, des concentrations élevées de SCP (> 10⁶ ufc/g) ont été décelées. L'échantillon disponible était insuffisant pour permettre la détection et la quantification des SE. De par les concentrations extrêmement élevées de SCP et l'apparition rapide de symptômes chez les patients, il est supposé que des concentrations élevées de SEA étaient présentes. Étant donné que ce foyer concernait de jeunes enfants, âgés de 9 mois à 2 ans, les conséquences de ce foyer auraient pu être beaucoup plus graves. Un profil identique de gènes se est observé entre l'isolat alimentaire et les isolats humains de SCP.

Comparaison entre les souches SCP d'origine humaine et d'origine alimentaire

Tous les isolats de SCP positifs au se, issus des trois foyers, ont été comparés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (Figure 1). Différents pulsotypes étaient en circulation chez les patients, chez les personnes ayant préparé les aliments, et au sein même des aliments, ce pour les trois foyers. Dans le foyer A, différents pulsotypes (à savoir 19, 37, 211, 212 et 213) ont été discernés chez les personnes ayant préparé les aliments mais aucune d'entre elles ne présentait le même pulsotype (210) que l'isolat alimentaire ou que les isolats issus des patients (Figure 1). Dans le foyer B, trois pulsotypes ont pu être discernés (à savoir 5, 195, 209). Pour le foyer C, toutes les souches isolées dans la purée de pommes de terre, chez les patients et chez la personne ayant préparé les aliments présentaient un pulsotype identique (à savoir 208).

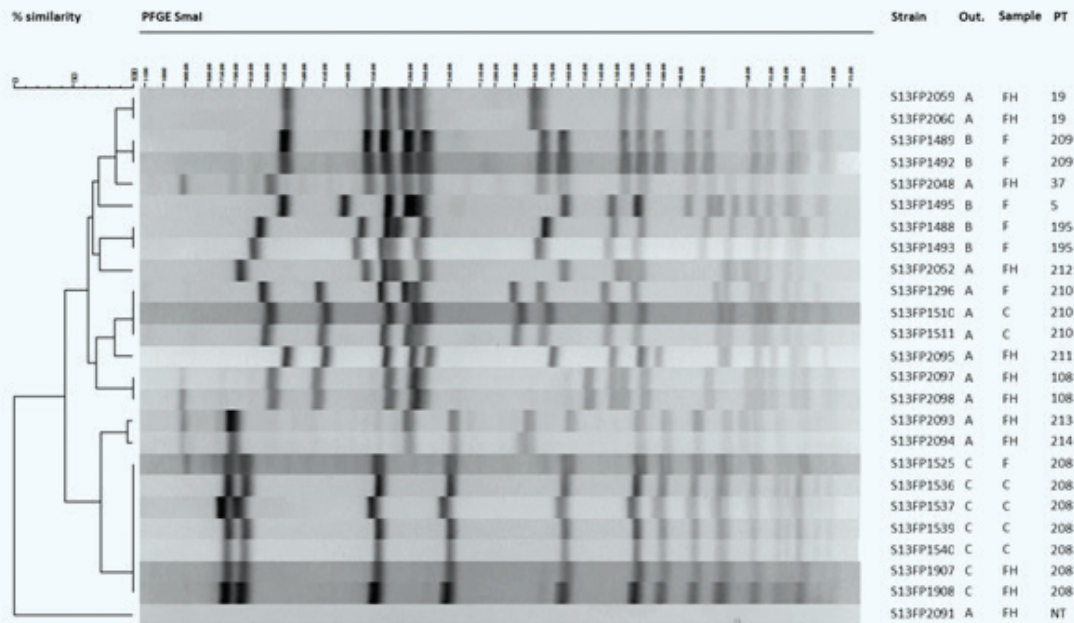


Figure 1. Comparaison des isolats alimentaires et humains dans le cadre des foyers A, B et C, au moyen de l'électrophorèse à champ pulsé (PFGE). Légende : Aliment (F) ; Patient (C) ; Personne en charge de la préparation des aliments (FH) ; Foyer (Out.) ; Pulsotype (PT)

Discussion

Trois intoxications alimentaires causées par des entérotoxines (SE) de staphylocoques à coagulase positive (SCP) ont été décrites plus haut dans cet article. Toutes trois sont considérées comme des foyers à forte évidence du point de vue microbiologique et épidémiologique, sur base de la nomenclature de l'EFSA. Sur base d'une analyse microbienne, l'implication du *Bacillus cereus* émétique en tant qu'agent causal a pu être exclue.

- L'entérotoxine staphylococcique A (SEA) est la SE la plus rapportée au niveau mondial dans les intoxications alimentaires aux SCP (Argudin et al., 2010). Cette SE était également la toxine incriminée dans les foyers de 2013, la SEA ayant été détectée tant au niveau phénotypique que génotypique dans les isolats de SCP issus des cas humains et des restes d'aliments. Des denrées alimentaires à base de pommes de terre, notamment de la purée et de la salade de pommes de terre, étaient impliquées dans les trois foyers décrits plus haut. Les SE ont pu être quantifiées dans ces denrées alimentaires, sauf pour le foyer C, pour lequel l'analyse n'a pas pu être réalisée en raison d'un échantillon insuffisant.



- Différentes méthodes analytiques ont été développées pour la détection et la quantification des SE, telles que des méthodes immunologiques et d'autres méthodes basées sur la spectrométrie de masse. Les deux types de méthode ont leurs limitations, essentiellement en ce qui concerne la disponibilité des anticorps, peptides et étalons spécifiques, mais on observe aussi une différence de sensibilité de la méthode de détection, comme il ressort également de nos résultats (Hennekinne et al., 2010; Hait et al., 2014; Wu et al., 2016). On observe ainsi une sensibilité plus faible au niveau du SET-RPLA par rapport au VIDAS SET2 et au Ridascreen. En outre, à l'heure actuelle, les méthodes ELISA disponibles sur le marché ne permettent la détection que des cinq SE classiques, de la SEA à la SEE, dans des matrices alimentaires, avec identification ou non des types de toxine SEA à SED (Hait et al., 2014 ; Nia et al., 2016a et b). Cependant, une activité émétique a également déjà été démontrée pour d'autres SE décrites mais aucune méthode de détection n'est encore disponible.
- Par ailleurs, la production de SE est influencée par différents facteurs tels que le pH, l'activité de l'eau, la température et d'autres paramètres (Hait et al., 2014). La présence de gènes de l'entérotoxine ne donne donc peut-être pas une indication correcte de la production de cette toxine, mais la PCR peut tout de même s'avérer un outil de dépistage précieux pour les staphylocoques isolés et pour les matrices alimentaires. De cette manière, il y a une indication sur la probabilité qu'une entérotoxine puisse être présente dans un aliment, même pour les SE décrites plus récemment pour lesquelles il n'existe pour l'instant pas de méthode de détection des toxines. La PCR a en effet non seulement permis de détecter, dans les isolats alimentaires et humains, des gènes codant pour les entérotoxines classiques (sea, sec ou sed), mais aussi des gènes codant pour d'autres SE (seg, seh, sei, sej, ser et sep), une activité émétique ayant déjà été décrite pour certaines d'entre elles.
- La quantité exacte d'entérotoxine donnant lieu à l'apparition de symptômes n'est toujours pas connue. Si l'on considère qu'une portion moyenne équivaut à cent grammes, les quantités détectées ayant donné lieu aux symptômes de vomissement et ensuite de diarrhée sont alors comprises entre 1,9 ng (purée de pommes de terre, foyer A) et 14,7 ng (pommes de terre, foyer B). Ces niveaux sont bien inférieurs à ceux décrits dans des études antérieures réalisées sur des personnes volontaires saines de sexe masculin, lors desquelles l'ingestion orale de 3,5 µg de SEA, SEB ou SEC pure avait causé des vomissements et/ou diarrhées chez tous les individus (Bennet et al., 2005). Des quantités comprises entre 20-100 ng ont été décrites précédemment comme étant effectives dans les intoxications alimentaires à staphylocoques (SFP) (Hennekinne et al., 2012). Des recherches réalisées récemment à l'aide de modèles dose-réponse basés sur les données de foyers, démontrent que 6,1 ng de SEA suffisent pour provoquer des symptômes chez 10% de la population exposée (dose benchmark (BMD10)) (Guillier et al., 2016). Dans le cas du foyer A, la présence de plusieurs entérotoxines, d'ailleurs susceptibles d'exercer un effet synergique, ne peut être exclue puisque les isolats de *S. aureus* contiennent également d'autres gènes d'entérotoxine (sea, sed, seg, sei, sej et ser). Bien que SEG, SEH, SEI, SES et SET présentent toutes une activité émétique et jouent donc un rôle potentiel dans les SFP, des méthodes permettant la détection de ces toxines dans les aliments doivent encore être développées (Omoe et al., 2013, Ono et al., 2015).
- Le Règlement européen 2073/2005 impose que la présence de SE soit analysée dans le fromage et dans le lait ou lactosérum en poudre, uniquement lorsque la quantité de SCP s'élève à minimum 10^5 ufc par gramme d'aliment (critère d'hygiène des denrées alimentaires), les SE devant être absentes (critère de sécurité des denrées alimentaires) des produits mis sur le marché et ce jusqu'au terme de la durée de conservation de ceux-ci. Il n'existe actuellement pas encore de critères pour les autres denrées alimentaires, mais la détection directe des SE dans les aliments, notamment en cas d'intoxications alimentaires, revêt tout de même de l'importance vu que ces toxines sont résistantes à la chaleur. Dès lors, une donnée intéressante est la détection de SEA dans la purée de pommes de terre, avec la détection de seulement 270 ufc de SCP par gramme de purée. Ceci confirme des observations faites antérieurement, selon

lesquelles des SE préformées peuvent survivre dans les denrées alimentaires ayant subi un traitement thermique, à l'inverse de *S. aureus*, si bien qu'un dénombrement des SCP ne peut en soi pas être utilisé pour la caractérisation d'un foyer SFP (Hennekinne et al., 2010).

- Différentes méthodes de typage moléculaire ont déjà été utilisées pour la comparaison de souches de *Staphylococcus aureus* dans le cadre de l'analyse de foyers, parmi lesquelles la MLVA, le typage spa et l'électrophorèse à champ pulsé (PFGE) (Roussel et al., 2015). Jusqu'à aujourd'hui, la PFGE demeure la référence pour le typage des SCP, même si l'utilisation de nouvelles techniques moléculaires telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) gagne en popularité pour l'analyse des foyers et le typage des souches, et soit également très prometteuse à des fins de surveillance (Hennekinne et al., 2003, Bartels et al., 2014, Robinson et al., 2013, EFSA avis 2013). L'utilisation de ces méthodes de typage revêt de l'importance vu que la présence de SE ou de gènes se n'est pas suffisamment discriminante pour permettre de corréler un aliment contaminé à un patient, à une personne en charge de la préparation des aliments ou à un opérateur. Pour le foyer A, par exemple, deux isolats d'une personne ayant préparé les aliments appartenaient à un pulsotype différent (213 et 214) alors qu'ils présentaient un profil identique de gènes se. Par ailleurs, la PFGE a pu démontrer que les isolats de *S. aureus* entérotoxigène (sea, seg, sei) provenant des patients du foyer C, étaient identiques à l'isolat provenant de l'aliment et appartenaient au pulsotype 208. En outre, l'isolat provenant de la personne ayant préparé les aliments, en l'occurrence la gardienne d'enfants, présentait le même pulsotype, ce qui signifie que la souche s'était probablement retrouvée dans la purée de pommes de terre via la gardienne. La manière dont la souche est parvenue dans l'aliment reste inconnue pour les foyers A et B mais, dans le cadre du foyer A, la PFGE a tout de même permis de corréler l'aliment aux patients vu qu'un pulsotype identique (à savoir 210) a été observé au niveau des isolats. Il est également à noter que la comparaison des génomes permet non seulement de démontrer, mais aussi d'exclure, l'implication des personnes ayant préparé les aliments.
- Une SFP est habituellement corrélée à une mauvaise manipulation d'aliments cuits ou transformés, suivie par une conservation dans des conditions permettant la croissance de *S. aureus* et la production de toxines. La présence de gènes d'entérotoxine dans des isolats de SCP issus de porteurs sains, parmi lesquels des personnes en charge de la préparation des aliments, souligne le risque de contamination des denrées alimentaires au cours de la préparation et de la transformation de celles-ci. De plus, un grand nombre de nos isolats contiennent des gènes d'entérotoxine qui diffèrent des SE classiques et dont le rôle exact dans les intoxications alimentaires n'est pas toujours connu. Dans le foyer A, trois personnes ayant préparé les aliments se sont révélées positives du point de vue d'isolats de *S. aureus* contenant le gène seh, ce qui est également décrit dans des foyers survenus antérieurement au Japon et en Norvège (Hait et al., 2014, Jorgesen et al., 2005). Le prélèvement répété d'échantillons auprès d'une grande population de porteurs sains, parmi lesquels des personnes en charge de la préparation des aliments, en Chine entre 2002 et 2012 a mis en évidence une augmentation significative de certains gènes se, parmi lesquels le seh (Ho et al., 2015). Ces études démontrent la nécessité de disposer de méthodes capables de détecter notamment les SEH directement dans les aliments. Dans les foyers décrits ici, pas le moindre isolat de SCP d'origine alimentaire n'a été décelé positif au gène seh. La combinaison de gènes se, désormais appelée « profil de gènes se », peut également donner une première indication d'un lien potentiel entre un aliment contaminé et un patient. C'est le cas pour les foyers A et C, un profil identique de gènes se étant observé entre l'isolat alimentaire et un ou plusieurs isolats humains de SCP.



Conclusion

Trois foyers SFP causés par des souches de *S. aureus* producteur d'entérotoxine A ont été exposés dans cet article. Des méthodes de détection moléculaire, parmi lesquelles la PCR conventionnelle ou en temps réel, peuvent être utilisées pour évaluer la capacité génétique des souches isolées à produire des entérotoxines. Le typage moléculaire des isolats de SCP peut également aider dans le cadre des investigations menées en amont et en aval du foyer en vue d'en découvrir la source. La détection et l'identification des SE émétiques autres que les SEA-SEE, seront importantes afin de parvenir à une augmentation du nombre de foyers rapportés à forte évidence. Étant donné qu'il est difficile de développer des méthodes immunologiques basées sur ELISA pour la détection des SE, les méthodes PCR continuent de fournir des informations complémentaires dans le cadre de l'analyse des foyers SFP. Dans le cas de foyers d'origine alimentaire, l'enquête devrait comporter d'une part l'analyse d'écouvillons prélevés au niveau du nez ou de la gorge des personnes ayant manipulé les denrées alimentaires, et d'autre part l'analyse de tous les composants alimentaires ou restes d'aliments. Ceci requiert une approche coordonnée au sein d'une équipe multidisciplinaire, rassemblant des personnes spécialisées dans la santé animale et la santé humaine ainsi que des épidémiologistes et des microbiologistes spécialisés dans les denrées alimentaires. Les bonnes pratiques d'hygiène, en ce compris l'hygiène des mains et le fait de conserver ou de réchauffer correctement les denrées alimentaires, revêtent une importance cruciale dans la prévention des foyers SCP.

Légende des tableaux :

F : aliment ;

C : patient ;

FH : personne en charge de la préparation des aliments ;

N/A : non analysé ;

D : détecté ;

ND : non détecté ;

type SE : type entérotoxine staphylococcique

* : les échantillons d'origine humaine provenant d'un même C ou FH sont indiqués à l'aide d'un exposant identique.

a méthode commerciale (VIDAS et/ou Ridascreen sur les aliments, SET-RPLA sur la souche).

b méthode ELISA propre au laboratoire méthode

Références

1. Humphries, R.M.; Linscott, A.J. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, 28, 3-31. doi: 10.1128/CMR.00073-14
2. Hennekinne, J.A.; de Buyser, M.L.; Dragacci, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 815-836. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
3. Ono, H.K.; Sato'o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K.; Hu, D. L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 7034-40. doi: 10.1128/AEM.01873-15
4. Argudin, M.A.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins* 2010, 2, 1751-1773. doi: 10.3390/toxins2071751
5. Omoe, K.; Hu, D.L.; Ono, H.K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect Immun.* 2013, 81, 3627-3631. doi: 10.1128/IAI.00550-13
6. Nia Y.; Mutel, I.; Assere, A.; Lombard, B.; Auvray, F.; Hennekinne, J.A.. Review Over a 3-Year Period of European Union Proficiency Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Food Matrices. *Toxins* 2016, 8, 107-121. doi: 10.3390/toxins8040107
7. Nia Y.; Rodriguez, M.; Zeleny, R.; Herbin, S.; Auvray, F.; Fiebig, U.; Avondet, M.A.; Munoz, A.; Hennekinne, J.A. Organization and ELISA-Based Results of the First Proficiency Testing to Evaluate the Ability of European Union Laboratories to Detect Staphylococcal Enterotoxin Type B (SEB) in Buffer and Milk. *Toxins* 2016, 8, 268-281. doi: 10.3390/toxins8090268
8. Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 1-10.
9. Kluytmans, J.A.; Wertheim, H.F. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. *Infection* 2005, 33, 3-8.
10. Kummel, J.; Stessl, B.; Gonano, M.; Walcher, G.; Bereuter, O.; Fricker, M.; Grunert, T.; Wagner, M.; Ehling-Schulz, M. Staphylococcus aureus Entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from Dairy Cow to Cheese. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1603.
11. EFSA. 2013. «The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011.» In, edited by EFSA Journal, 250. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3129
12. EFSA. 2014a. «The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012.» In, edited by EFSA Journal, 312. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3547
13. EFSA. 2014b. «The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.» In, edited by EFSA Journal, 165. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991
14. EFSA. 2015. «The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.» In, edited by EFSA Journal, 191. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329
15. EFSA. 2016. «The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and



- food-borne outbreaks in 2015.» In, edited by EFSA Journal, 231. European Food Safety Authority. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
16. Hennekinne, J.A.; Ostyn, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Pruger, A.L.; Dragacci, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins* 2010, 2, 2106-2116. doi: 10.3390/toxins2082106
 17. Roussel, S.; Felix, B.; Vingadassalon, N.; Grout, J.; Hennekinne, J.A.; Guillier, L.; Brisabois, A.; Auvray, F. Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 882. doi: 10.3389/fmicb.2015.00882
 18. Bennett, R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J. Food Prot.* 2005, 68, 1264-1270.
 19. Hait, J.M.; Tallent, S.M.; Bennett, R.W. Screening, detection, and serotyping methods for toxin genes and enterotoxins in Staphylococcus strains. *J. AOAC Int.* 2014, 97, 1078-1083.
 20. Wu, S.; Duan, N.; Gu, H.; Hao, L.; Ye, H.; Gong, W.; Wang, Z. A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins* 2016, 8, 176-195. doi: 10.3390/toxins8070176
 21. Guillier, L.; Bergis, H.; Guillier, F.; Noel, V.; Auvray, F.; Hennekinne, J.-A. Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data. *Procedia Food Science.* 2016, 7, 129-132.
 22. Hennekinne, J.-A.; Kerouanton, A.; Brisabois, A.; De Buyser, M.L. Discrimination of Staphylococcus aureus biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 94, 321-329.
 23. Bartels, M.D.; Petersen, A.; Worning, P.; Nielsen, J.B.; Larner-Svensson, H.; Johansen, H.K.; Andersen, L.P.; Jarløv, J.O.; Boye, K.; Larsen, A.R.; Westh, H. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 4305-4308. doi: 10.1128/JCM.01979-14
 24. Robinson, E.R.; Walker, T.M.; Pallen, M.J. Genomics and outbreak investigation: from sequence to consequence. *Genome Medicine* 2013, 5, 36. doi: 10.1186/gm440
 25. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA journal* 2013, 11, 3502. doi : 10.2903/j.efsa.2013.3502
 26. Ho, J.; Boost, M.; O'Donoghue, M. Prevalence of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus colonising food handlers: does nasal carriage status matter? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015, 34, 2177-81.
 27. Jorgensen, H.J.; Mathisen, T.; Løvseth, A.; Omoe, K.; Qvale, K.S.; Loncarevic, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 252, 267-72.

Workshops & Symposia

Vous trouverez l'agenda des formations pour les laboratoires agréés, organisées par l'AFSCA en collaboration avec les laboratoires nationaux de référence sur le site de l'AFSCA (www.afsca.be > Professionnels > Laboratoires > Séminaires & Workshops).

Ce tableau est régulièrement mis à jour, consultez donc régulièrement notre site internet.

D'autres workshops et symposia intéressants sont repris ci-après.

Date	Subject	Place	More information (website)
5-7 november 2018	4th International Congress "Food Quality, Technology and Safety"	Berlin, Germany	http://unitedscientificgroup.com/conferences/food-chemistry-and-technology/
23-25 october 2018	18th International Symposium "Feed Technology"	Novi Sad, Serbia	http://foodtech.uns.ac.rs/
10-11 october 2018	Workshop "Use of reference materials and the estimation of measurement uncertainty"	Geel, Belgium	https://ec.europa.eu/jrc/en/event/training-course/use-reference-materials-and-estimation-measurement-uncertainty-2018
18 october 2018	Symposium "Food Allergens: regulation, management and detection"	Brussel, Belgium	http://www.cergroupe.be/fr/news/83-symposium-international-2-edition.html
19-21 september 2018	Innovations in Food Analysis 2018	München, Germany	http://www.ifaiconference.com/
9-12 october 2018	Workshops on 'The use of DNA barcoding, from theory to practice'	Paris, France	https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf
11-14 december 2018	Workshops on 'The use of DNA barcoding, from theory to practice'	Wageningen, Netherlands	https://www.euphresco.net/media/events/dna_barcoding_2018.pdf
4-5 october 2018	Twenty-third Conference on Food Microbiology	Brussel, Belgium	https://www.bsfm.be/
12-14 september 2018	Pesticides 2018 - International Conference	Bologna, Italy	https://events.unibo.it/10thpesticides-16thchemistry-fatemodernpesticides-10thmgpr-symposium2018
26-31 august 2018	10th International PCB Workshop : DIOXIN 2018	Kraków, Poland	http://dioxin2018.org/
19-24 may 2019	14th IUPAC International Congress of Crop Protection Chemistry	Ghent, Belgium	https://www.iupac2019.be/
2-6 June 2019	67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics	Atlanta, GA, USA	https://machprinciple.com/conference5.php?conf=67th-ASMS-Conference-on-Mass-Spectrometry-and-Allied-Topics&slno=809





Labinfo