



## **AVIS**

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

**relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées.**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

#### **1. APPEL DE LA SAISINE**

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail s'est autosaisie le mercredi 29 juin 2011 d'une demande d'avis en urgence portant sur l'état des connaissances scientifiques et les informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU) observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées.

#### **2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Le 22 juin 2011, des cas de diarrhée hémorragique et de SHU se sont déclarés chez des adultes, majoritairement des femmes, dans la région de Bordeaux. Les premières investigations menées sur ces cas ont permis d'incriminer une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) appartenant au sérotype O104:H4, une bactérie génétiquement liée à celle responsable de l'épidémie déclarée en Allemagne en mai 2011

Une enquête de traçabilité européenne, coordonnée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), avec le support des autorités sanitaires des états membres de l'Union Européenne, a été réalisée pour tenter d'identifier une éventuelle source commune.

Suite à la publication du rapport de l'EFSA le 5 juillet 2011, relatif à cette étude de traçabilité qui met en évidence un lien entre les cas de toxi-infections à *E. coli* O104:H4 et des graines importées d'Égypte<sup>1</sup>, la Commission Européenne a pris la décision, le même jour, de retirer du marché, puis analyser et détruire l'ensemble des lots de graines de fenugrec importées en Europe entre 2009 et 2011 par un exportateur égyptien. Cette décision prévoit également de suspendre jusqu'au 31 octobre les importations de graines et de fèves égyptiennes destinées à la germination<sup>2</sup> (graines, fruits et spores à ensemercer; légumes à cosse, écosés ou non, à l'état frais ou réfrigéré; fenugrec; légumes à cosse secs, écosés, même décortiqués/cassés; fèves de soja, même concassées; graines et fruits oléagineux, même concassés).

L'Anses a mis en place, en lien avec des experts de ses laboratoires ainsi que du laboratoire national de référence (Vet-AgroSup, Lyon), du centre national de référence (Institut Pasteur, Paris) et de son laboratoire associé (CHU Robert Debré, Paris), de l'institut de veille sanitaire (InVS), de l'INRA (Avignon et Angers) et du Geves (Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences) ainsi que de l'unité INSERM1043 de l'École vétérinaire de Toulouse, un groupe de travail destiné à partager l'expérience acquise et à mettre en œuvre toutes les connaissances scientifiques et techniques facilitant la compréhension de la situation et la détection d'*Escherichia coli* O104:H4 sur les graines germées et/ou à germer de fenugrec, suspectées d'être à l'origine des deux épidémies.

La mise en évidence de la bactérie pathogène dans ces graines est difficile et il suffit d'un très faible nombre de bactéries pathogènes pour déclencher la maladie. Le présent document a donc pour objectif de :

- souligner les principaux éléments disponibles concernant la bactérie pathogène impliquée et les données d'épidémiologie liées à celle-ci ;
- souligner les étapes critiques à prendre en compte dans le procédé de fabrication des graines germées et les sources possibles de contamination aux différentes étapes du procédé de production ;
- de faire un point d'information sur l'épidémie en cours ;
- de dresser la liste des points critiques qui devraient faire l'objet d'une attention particulière pour les investigateurs ;
- de formuler des recommandations pour les consommateurs et les opérateurs.

### **3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence « *Escherichia coli* O104:H4 / graines germées » entre le 29 juin et le 5 juillet 2011. Ce groupe d'experts s'est réuni le 30 juin 2011 par téléconférence et a formulé l'avis suivant, validé le 6 juillet 2011 par moyens télématiques.

### **4. ANALYSE ET CONCLUSION DU GECU**

La dénomination STEC (pour Shiga-toxin producing *Escherichia coli*) ou VTEC (Vero-toxin producing *Escherichia coli*), qui sont strictement équivalentes, regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant les gènes *stx* codant des toxines particulières, appelées shigatoxines (Stx) ou vérotoxines. Il s'agit donc d'une définition génétique. Néanmoins, les souches de STEC ne sont pas

<sup>1</sup> European Food Safety Authority; Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. Question No EFSA-Q-2011-00817, issued on 05 July 2011.

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/176e.htm>, consulté le 5 juillet 2011.

<sup>2</sup><http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/11/831&format=HTML&aged=0&language=FR&guiLanguage=en>, consulté le 5 juillet 2011

toutes pathogènes pour l'homme. Seul un petit nombre d'entre elles sont à l'origine cas de diarrhée, ou de diarrhée sanglante et d'une complication grave, le SHU qui est la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant de moins de 3 ans. Les souches de STEC, impliquées dans l'apparition de ces symptômes chez l'Homme, sont dites entérohémorragiques. On parle alors de souches dites EHEC (pour enterohaemorrhagic *E. coli*). Il s'agit donc ici d'une définition clinique, sur la base des symptômes observés chez l'homme.

La distinction faite entre les deux définitions (génétique et clinique) tient au fait que la liste exhaustive des gènes de virulence impliqués dans le pouvoir pathogène des EHEC n'est pas connue à ce jour. Ainsi, tous les EHEC sont capables de produire au moins une toxine Stx (Stx1 et/ou Stx2) et possèdent au moins l'un des gènes *stx* (*stx1* et/ou *stx2*). Tous les EHEC (dont la souche O104:H4) sont donc des STEC mais les STEC ne sont pas tous des EHEC (les souches STEC ne sont pas toutes pathogènes pour l'homme).

D'un point de vue épidémiologique, il est essentiel de pouvoir différencier les isolats d'*E. coli*. Aussi, chaque souche d'*E. coli* (pathogène ou non) peut être classée sur la base de l'étude de ses antigènes de surface :

- les antigènes O somatiques, de nature polysaccharidique, forment une partie de la membrane externe de la paroi bactérienne. Déterminé à l'aide d'antisérum, cet antigène permet de classer les *E. coli* en sérogroupes (O157, O104, etc.) ;
- les antigènes H flagellaires, constitués de flagelline et placés à la surface de la paroi, permettent la mobilité bactérienne.

L'association des antigènes O et H permet de classer les *E. coli* en sérotype, au sein de chaque sérotype (par exemple, O104:H4). Il s'agit plutôt de marqueurs épidémiologiques, le lipopolysaccharide qui constitue la paroi bactérienne n'est pas en lui-même un facteur de virulence, proprement dit, responsable de véritables symptômes cliniques.

Aussi, d'autres marqueurs génétiques sont recherchés au sein d'une bactérie ou dans une matrice alimentaire, hors contexte clinique, tels que les gènes codant pour les antigènes somatiques et flagellaires (par exemple, le gène *wzx*O104 spécifique du sérotype O104).

Les EHEC dits typiques possèdent un facteur d'adhésion caractéristique, l'intimine, codé par le gène *eae* (Afssa 2010) et sont capables de produire des shigatoxines. Par ailleurs, les EHEC appartenant au sérotype O157:H7 sont les souches les plus fréquemment isolées et à l'origine de plusieurs épidémies à EHEC dans le monde.

## ■ Bilan des informations disponibles en lien avec l'épisode épidémique

### • Situation épidémiologique en France

Le 22 juin 2011, deux hôpitaux de Bordeaux ont signalé à la Cire (Cellules de l'Institut de veille sanitaire en région) Aquitaine six premiers cas de diarrhée sanglante et deux cas de SHU. Une investigation épidémiologique a été aussitôt mise en œuvre afin d'identifier la source de cet épisode de cas groupés (Gault G 2011).

Au total, le 5 juillet 2011, 7 cas de SHU, 4 cas de diarrhée sanglante et un cas de diarrhée simple ont été identifiés. Ces 12 personnes ont toutes participé le 8 juin à une journée « portes ouvertes » dans un Centre de Loisirs de la Petite Enfance (CLPE) à Bègles. Ces 12 personnes sont 7 femmes et 5 hommes, âgés de 6 à 64 ans. Tous ont rapporté avoir consommé des graines germées lors de cette journée. Les symptômes de ces 12 personnes ont débuté entre le 13 et le 20 juin. Une infection à EHEC O104:H4 a été confirmée pour 8 des 12 personnes. Le diagnostic microbiologique des autres cas est en cours.

Une étude de cohorte portant sur l'ensemble des personnes ayant participé à la journée « portes ouvertes » du CLPE, a débuté le 29 juin pour documenter cet épisode d'un point de vue épidémiologique et clinique. Deux cas de transmission interhumaine au sein d'une même famille ont été observés.

Suite à la publication du rapport EFSA relatif à une étude de traçabilité au niveau européen qui met en évidence un lien entre les cas d'intoxication et les graines importées d'Égypte, la commission européenne a pris la décision de retirer du marché, puis analyser et détruire l'ensemble des lots de graines de fenugrec importées entre 2009 et 2011 par un exportateur égyptien. Cette décision prévoit également de suspendre jusqu'au 31 octobre les importations de graines et de fèves égyptiennes destinées à la germination. »

- Investigations concernant la traçabilité

Les graines consommées au CLPE, lors de la fête du 8 juin 2011, sont des graines de fenugrec bio, de roquette et moutarde achetées chez Jardiland et mises à germer au CLPE dans des pots de confiture individuels vides, sans substrat particulier.

Le fournisseur de Jardiland est la société C (UK), qui commercialise ces graines en sachet après reconditionnement par ses soins. Leurs approvisionnements sont les suivants :

- fenugrec bio (consommé au CLPE) : société A (grossiste importateur primaire), située en Allemagne et s'approvisionnant en Egypte ;
- fenugrec conventionnel, roquette et moutarde : société D, située en Italie et s'approvisionnant en Inde.

La société A a également approvisionné la ferme impliquée dans l'épidémie allemande en fenugrec bio en provenance d'Egypte, ce qui constitue donc un point commun entre ces deux épisodes.

Les investigations de traçabilité sont conduites à l'échelle internationale dans le cadre d'une Task Force réunissant les Pays-Bas, le Royaume-Uni, l'Italie, l'Allemagne et la France depuis le 27 juin 2011 sous l'égide de l'EFSA. Un rapport, publié le 5 juillet 2011, dresse le bilan des informations collectées et des conclusions des investigations de l'étude de traçabilité, menée dans le but de déterminer et documenter chaque étape de la chaîne, depuis la production jusqu'à la distribution, concernant les produits suspectés d'être à l'origine des épidémies observées en Allemagne et en France en mai-juin 2011. Cette enquête a permis de déterminer que le lot # 48088 importé d'Egypte en novembre 2009 et reçu en Allemagne par un grossiste importateur primaire A en décembre 2009 a fait l'objet d'une commercialisation vers un grossiste répartiteur allemand B en décembre 2009 et vers un grossiste répartiteur anglais C en janvier 2010. Le grossiste répartiteur allemand B a fourni le producteur de graines germées allemand en février 2011 et le grossiste répartiteur anglais C a fourni le distributeur français en janvier 2011. Un même lot initial a donc probablement été utilisé lors des deux épidémies allemande et française. Ce lot a été distribué au total dans 70 entreprises de 12 pays européens.

L'enquête de traçabilité aval concernant la distribution du lot suspecté de graines de fenugrec « bio » en France a indiqué que l'entreprise C fournit quatre enseignes dont Jardiland.

- Caractéristiques de la souche en cause dans l'épisode épidémique

Les souches d'*E. coli* O104:H4, isolées chez 5 cas déclarés de SHU en juin 2011, dans la région de Bordeaux et associés à la consommation de graines germées, ont été caractérisées (Gault G 2011). Ces isolats sont similaires à ceux identifiés et caractérisés dans le cadre de l'épidémie observée en mai-juin en Allemagne de cette même année (Bielaszewska, Mellmann et al. 2011). En effet, ils présentent des profils moléculaires non distinguables, obtenus par électrophorèse en champ pulsé à l'aide des enzymes *Xba*I et *Not*I (méthode de comparaison des profils de restriction de l'ADN total des bactéries) (Gault G 2011). Ceci signifie que ces souches sont reliées, d'un point de vue épidémiologique, car génétiquement similaires, voire identiques (ce qui ne pourra être confirmé que par séquençage complet de ces souches qui est en cours). Cette homologie des isolats issus des patients français et de ceux des patients allemands, combinée au caractère rare de la souche à l'origine de ces épidémies, laisse supposer que ces deux événements sont liés à une source commune.

Cette souche épidémique appartient au sérotype O104:H4, et possède le gène *stx2* (variant *stx2a*) qui code la toxine STX2. Elle ne possède pas les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant la toxine EAST1) mais héberge le gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae responsables d'une très forte adhérence à la muqueuse intestinale. Par ailleurs, cette souche présente un profil de multi-résistance aux antibiotiques (résistance aux molécules suivantes : ampicilline, céfotaxime, ceftazidime, streptomycine, sulfaméthoxazole, triméthoprim, cotrimoxazole, tétracycline et acide nalidixique). Les analyses PCR ont permis d'identifier la présence du gène *bla*CTX-M-15 codant une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et celle du gène *bla*TEM codant une pénicillinase.

Plus précisément, cette souche épidémique héberge un plasmide, nommé Inc11/pST31/CTX-M-15, qui présente un profil pST31 par pMLST (pour plasmid Multi Locus Sequence Typing). Ce plasmide

comprend le gène *bla*CTX-M-15, souvent retrouvé au sein de bactéries isolées chez l'Homme, notamment pour le genre bactérien *Salmonella*, au sein de souches isolées de malades en Afrique (Weill, Perrier-Gros-Claude et al. 2004). Par ailleurs, des souches isolées chez l'animal sont également décrites avec cette association pST31 – CTX-M-15 pour des isolats issus de bovins au Royaume-Uni (Kirchner, Wearing et al. 2011) et le sous-type plasmidique pST31 a déjà été décrit pour des *Salmonella* isolées chez des bovins en France (Madec, Doublet et al. 2011).

Concernant le sérotype de la souche épidémique (O104), il n'a été que très rarement décrit dans la littérature comme étant associé à des cas d'infections humaines sévères. Certaines souches de EHEC O104:H21 ont été recensées dans le monde mais elles restent impliquées dans des cas de moindre importance en terme de gravité et de fréquence. Une épidémie a été rapportée avec une souche d'EHEC O104:H21 dans l'état du Montana en 1994 (Feng, Weagant et al. 2001). Une souche O104:H4 de type MLST 678 (comme celui de l'épisode allemand de 2011) avait été isolée en Allemagne chez un cas de SHU dès 2001 (Mellmann, Bielaszewska et al. 2008). Un cas d'infection humaine à O104:H4 a été recensé en Corée du Sud en 2005 (Bae, Lee et al. 2006). Il s'agissait d'une femme de 29 ans qui présentait un cas de SHU mais pour qui, il n'a pas été mis en évidence de relation avec la consommation d'un éventuel aliment contaminé. Cette souche coréenne est génétiquement différente de la souche responsable des épidémies allemande et française actuelles. En France, deux souches ont été précédemment isolées chez des patients atteints de SHU (2004 et 2009) et trois souches O104:H4 ont également été décrites en Finlande et Géorgie (2009 et 2010) (Scheutz, Moller Nielsen et al. 2011). Finalement, très peu de souches d'EHEC, appartenant au sérotype O104, sont recensées dans les collections de souches décrites jusqu'à présent et les caractéristiques épidémiologiques associées sont le plus souvent différentes de la souche épidémique actuelle.

La souche épidémique de sérotype O104:H4 est donc tout à fait particulière. Elle n'a pas de gène *eae* mais possède d'autres facteurs d'adhésion qui sont caractéristiques des souches dites EAEC (pour Entero-Aggregant *E. coli*) et leur confère une capacité à la formation de biofilms (Scheutz, Moller Nielsen et al. 2011). Ces souches EAEC sont connues pour adhérer très fortement à la muqueuse intestinale. Ainsi l'adhésion est beaucoup plus forte que celle observée pour les EHEC, qui sont éliminés généralement de la muqueuse intestinale en 8 à 10 jours. Les patients affectés par cette souche épidémique sont probablement soumis à l'exposition à la toxine Stx 2 pendant un laps de temps prolongé, ce qui pourrait expliquer la sévérité des cas observés en Allemagne et en France et la mortalité inhabituellement élevée (48 morts pour le foyer allemand, plus 2 autres décès rapporté en Suède et aux Etats-Unis, au 1<sup>er</sup> juillet 2011).

Cette souche épidémique n'est pas un EHEC sur le plan génétique mais une souche d'EAEC qui a acquis un gène *stx2*. En effet, la séquence génomique de la souche épidémique ressemble très fortement à celle d'une souche africaine d'EAEC O104:H4 (souche 55989), précédemment identifiée chez un patient HIV positif qui souffrait de diarrhée persistante (Bernier, Gounon et al. 2002). Cette souche O104:H4 est génétiquement très différente des autres souches d'EHEC O104 (notamment O104:H21) qui ont été isolées jusqu'à présent lors d'épidémies. Une autre souche entéroaggrégative et productrice de toxines Stx a été précédemment décrite lors d'une épidémie française survenue en 1994, mais elle appartenait à un autre sérotype (O111:H2) (Morabito, Karch et al. 1998).

Ces souches EAEC sont rares en Europe mais connues pour provoquer des cas de diarrhée aqueuse (maladie du voyageur) dans d'autres pays où les conditions d'hygiène et les difficultés d'approvisionnement en eau potable sont mises en cause dans l'apparition de ces cas de diarrhée (Scheutz, Moller Nielsen et al. 2011).

Les *E. coli* pathogènes intestinaux virulents pour l'homme ne sont habituellement pas aussi résistants aux antibiotiques. En particulier, ils n'hébergent que très exceptionnellement des bêta-lactamases à spectre étendu. La situation actuelle associe une épidémie grave, un sérotype rare (O104:H4) et une résistance aux antimicrobiens préoccupante en médecine humaine (BLSE).

- Méthodes de recherche de la bactérie dans les aliments et difficultés méthodologiques
  - Point sur la particularité de l'état physiologique des bactéries dans les graines

Les graines véhiculent une microflore très diversifiée dont la charge varie en fonction des conditions de production, de traitement post récolte et de stockage, et selon la nature même de l'espèce végétale.

Les graines représentent un environnement particulièrement stressant pour les microorganismes, l'activité de l'eau y étant très faible ( $a_w$  optimum pour la conservation des graines = 0.33, O. Leprince, communication personnelle). La contamination d'une graine est spatialement hétérogène. Les téguments des graines peuvent être contaminés sur leurs faces externes, mais également internes et certaines bactéries colonisent également les surfaces de l'embryon.

Les opérations de désinfection des graines ont ainsi une efficacité généralement limitée en lien avec la difficulté à atteindre les bactéries installées dans les sites les plus internes ou tout simplement pour les déloger des replis tégumentaires dans lesquelles elles se sont installées protégées par un biofilm. Cette difficulté de décontamination est bien sûr également liée au désir concomitant de conserver une bonne qualité germinative de la graine. L'activité métabolique des bactéries associées aux graines est extrêmement réduite, voire nulle. Les bactéries notamment phytopathogènes, survivent dans cet environnement, certaines pendant de très nombreuses années (plus de 15 ans pour certaines bactéries phytopathogènes sur le haricot) (Maude 1996). Il est fort probable que certaines entrent rapidement dans un état viable mais non cultivable suite au stress hydrique auquel elles sont confrontées. Cet aspect est peu documenté. De même la survie d'*E. coli* sur des graines pendant de longues durées est peu documenté (Beuchat and Scouten 2002).

- Point sur les méthodes de détection et d'identification des bactéries dans les graines

Une méthode officielle et harmonisée pour la recherche de souches STEC O104:H4 dans les aliments a été diffusée par le laboratoire de référence de l'Union européenne<sup>3</sup> et relayée par le laboratoire national de référence français<sup>4</sup>.

Brièvement, le protocole à utiliser est schématisé par la Figure 1. Lorsque la matrice à analyser est composée de graines à germer, il convient de prendre en compte les éléments suivants :

- 1- Les graines sont généralement contaminées à très faible niveau (0,1 à 1,8 cfu/g, à l'instar de *Salmonella* (Liao and Fett 2003).
- 2- Les graines sont généralement sèches. Par conséquent, les éventuelles souches STEC présentes sont *a priori* stressées. Néanmoins, la germination est une étape favorable à la revivification des bactéries car elle se déroule en conditions d'humidité, de chaleur et de libération potentielle de nutriments.
- 3- Les éventuelles bactéries présentes peuvent aussi bien se retrouver à la surface des graines qu'à l'intérieur des graines. Dans le dernier cas, moins fréquent, la contamination des graines se produit durant la croissance de la plante et la formation des graines (contamination primaire des cultures). La contamination en surface des graines, quant à elle, peut survenir durant toutes les étapes de la préparation, du stockage et des manipulations des graines (contamination secondaire).

Les bouillons d'enrichissement des graines à germer peuvent contenir des inhibiteurs des PCR utilisées pour la détection des *E. coli*, c'est la raison pour laquelle des contrôles internes sont intégrés dans les méthodes utilisées par le LNR (inhibiteurs de l'ADN polymérase).

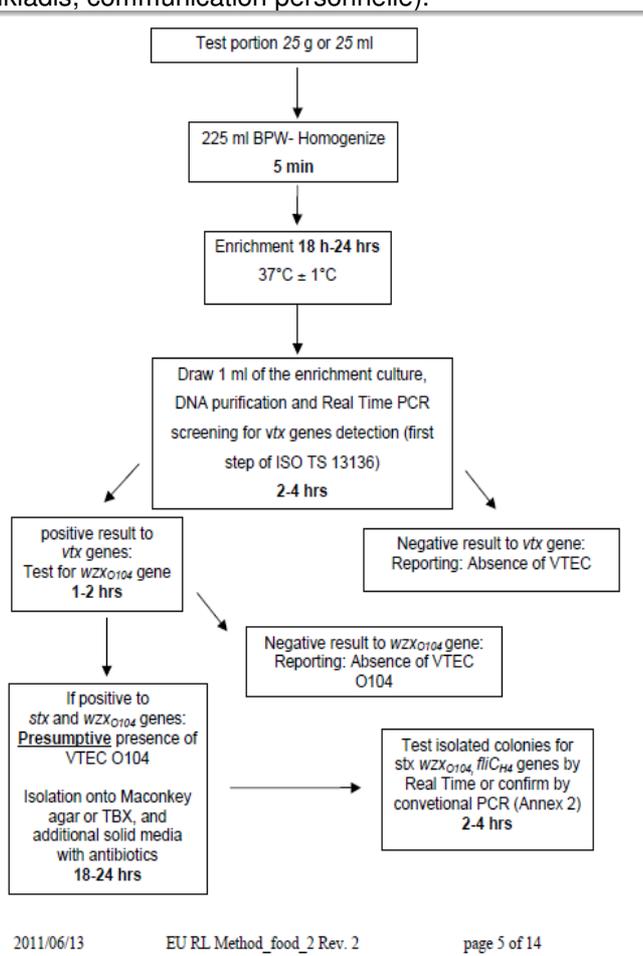
<sup>3</sup> Laboratory procedure for detection and identification of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 in food by Real-Time PCR. V2- EU reference laboratory for *E. coli*. Department of veterinary Public Health and Food Safety; Unit of Foodborne Zoonoses Istituto Superiore di Sanita. June 2011. Téléchargeable sur le site <http://www.iss.it/vtec/work/cont.php?id=152&lang=2&tipo=3>

<sup>4</sup> Détection des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) O104:H4 épidémiques dans les aliments (y compris végétaux) par PCR en temps réel, version 2/2, LNR français STEC/LMAP (Laboratoire d'études des microorganismes alimentaires pathogènes). Campus vétérinaire de Lyon. Vet-AgroSup Juin 2011. téléchargeable sur le site <http://www.vetagro-sup.fr/services/espace-entreprises/%C3%A9quipements-scientifiques/plateaux-techniques/lmap>

Ainsi, afin d'augmenter les performances de la méthode générale, pour l'analyse des graines à germer, et selon les recommandations du laboratoire communautaire de référence pour les *E. coli*, les étapes suivantes doivent être suivies :

- 1- La prise d'essai des graines à germer doit être de **50g** (au lieu des 25 g requis pour les autres matrices) afin d'augmenter la sensibilité du protocole.
- 2- Les graines à germer **doivent être écrasées** dans un contenant stérile (par exemple sac stomacher) en utilisant un pilon et un mortier ou tout autre outil identique (sous réserve de stérilité) avant d'ajouter le bouillon d'enrichissement. Attention cette étape est particulièrement délicate (risque de perforation des sacs stomacher, tripler voire quadrupler les épaisseurs)
- 3- Ajouter **450 ml d'eau peptonée tamponnée**. Attention au risque de perforation des sacs ; ne pas « stomacher » mais procéder à un mélange manuel.
- 4- Incuber les graines écrasées pendant **24h à 37°C +/- 1°C** (soit en statique soit sous agitation)
- 5- Prélever **5ml du bouillon d'enrichissement avec quelques débris de graines**.
- 6- Les **vortexer** afin de détacher les éventuelles bactéries adhérant aux débris de graines.
- 7- Les **centrifuger** 1 min à 500 g afin de sédimenter les débris.
- 8- Récupérer **1ml du surnageant** et l'utiliser pour la préparation des extraits d'ADN.
- 9- **L'ADN ainsi préparé sera dilué au 1/10 avant utilisation**. En cas d'absence d'amplification des contrôles internes utilisés, diluer l'ADN au 1/30.

Cette méthode harmonisée a été mise en œuvre par le LNR français. A noter que la prise d'essai nécessaire est de 50g (Loukiadis, communication personnelle).



**Figure 1 : Protocole d'analyse pour la détection et l'identification des STEC O104:H4 dans les aliments par PCR temps réel (source : Laboratoire de référence européen pour *E. coli*).**

Une autre méthode non officielle, impliquant une étape de germination de la graine, a également été mise au point par le LNR allemand (Beutin L, communication personnelle au LNR français). Si l'on considère que la germination des graines est à l'origine de la multiplication des *E. coli* O104:H4 responsables des deux épidémies, il est vraisemblable que le processus de germination soit à l'origine d'une levée du stress de la bactérie. La germination, est un processus mettant en œuvre des conditions d'humidité, de température et de libération de nutriments, potentiellement favorables à une reprise de la croissance bactérienne et la détection de *E. coli* O104:H4.

Néanmoins, cette méthode du LNR allemand nécessite un délai supplémentaire non négligeable (jusqu'à 10 jours pour les graines d'oignons et d'ail) et au minimum une prise d'essai de 100g de graines. Cette méthode optimisée a été mise en œuvre en parallèle et en complément de la méthode officielle par le LNR français quand la quantité d'échantillons à analyser reçue l'a permis (Loukiadis, communication personnelle).

D'autres méthodes de revivification utilisées par les phytopathologistes pour la détection de bactéries pathogènes des plantes dans les semences pourraient être également évaluées sous réserve de disposer d'une quantité suffisante d'échantillon du lot de fenugrec :

Méthodes officielles	Effectifs	Sous échantillons	Volume	Extraction des bactéries cibles	Méthodes
Légumineuses à grosses graines (haricot-pois-soja)	Minimum 5000 graines	5 X 1000	Volume eau déminéralisée stérile = 2,5 X poids sous éch de 1000 graines ex : 1L eau pour 200g de graines	Macération à 4°C 18-24h sous agitation	Isolements sur milieux semi-spécifiques <sup>567</sup>
Crucifères (chou)	Minimum 30000 graines	3 X 10000	100 mL solution saline - tween pour 10000 semences	Macération sous agitation 2h à 2h30 à température ambiante	Isolements sur milieux semi-spécifiques <sup>8</sup>

La germination entraîne une forte multiplication de la flore bactérienne associée aux semences (Darrasse, Darsonval et al. 2010). Selon les conditions de températures prévalant pendant la germination, les proportions relatives des différents membres dans la communauté peuvent varier et ainsi engendrer des problèmes lors de l'utilisation de test de détection reposant sur la qPCR, le ratio ADN cible/ ADN non cible pouvant être très largement non satisfaisant.

Le problème de la forte multiplication de la flore bactérienne (ou fongique) associée aux semences pose également des problèmes avec les méthodes microbiologiques telles que l'isolement sur milieux ou la BIO-PCR (enrichissement sur milieu solide suivi de PCR).

L'enrichissement en milieu liquide a parfois été testé sur matrices végétales mais n'a jamais été validé pour une utilisation en routine sur semences.

Il s'avère indispensable de disposer d'une méthode harmonisée au niveau européen pour pouvoir au minimum comparer les résultats obtenus. La mise à disposition de quantités suffisantes d'échantillons issus du lot de fenugrec soupçonné (les quantités présentes en France recensées à ce jour sont insuffisantes pour tester systématiquement plusieurs méthodes de revivification) auprès de plusieurs laboratoires européens pourrait permettre la comparaison de plusieurs méthodes sur une base harmonisée.

<sup>5</sup> Semences de haricot, détection de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* par isolement sur milieux nutritifs. Méthode **BHs/99/02** b.

<sup>6</sup> Semences de pois, détection de *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* par isolement sur milieux nutritifs. Méthode **BHs/99/03** b.

<sup>7</sup> Semences de soja, détection de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* par isolement sur milieux nutritifs. Méthode **BHs/99/04** b.

<sup>8</sup> Semences de crucifères, détection de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* par isolement sur milieux nutritifs. Méthode **BHs/99/05** b.

- Prélèvements réalisés et analyses effectuées

Des prélèvements de graines ont été effectués dans un premier temps au centre de loisirs et dans la jardinerie d'achat, et dans un deuxième temps complétés par des prélèvements dans un autre magasin (cf. tableau ci-dessous). Suite aux observations des Allemands (isolement de la souche O104:H4 dans l'eau de rinçage d'un sachet ayant contenu des graines germées et prélevé dans la poubelle d'un patient), le LNR a également procédé à la recherche des pathogènes dans l'eau de rinçage et sur les sachets des contenants des graines.

En termes de représentativité des échantillons, la quantité de certains échantillons prélevés au centre de loisirs (sachets entamés) et envoyés au LNR n'était pas suffisante (inférieure à 50g) ; il ne restait pas de sachet entamé de graines à germer de fenugrec bio au centre de loisirs.

Au 5 juillet 2011, aucun résultat positif n'a été obtenu sur les premiers produits prélevés (graines et emballages) par la méthode officielle et la méthode allemande.

Produit	Lieux de prélèvement	Quantités analysés	Résultats
Graines à germer Chou rouge	Centre de loisir	1 sachet entamé (9,3g)	Négatif (méthode officielle) dans la prise d'essai analysée (9,3g)
Graines à germer Adzuki	Centre de loisir	1 sachet entamé (21,4g)	Négatif (méthode officielle) dans la prise d'essai analysée (21,4g)
Graines à germer Oignon	Centre de loisir	1 sachet entamé (30,3g)	Négatif (méthode officielle) dans la prise d'essai analysée (30,3g)
Graines à germer Roquette	Centre de loisir	1 sachet entamé (39,7g)	Négatif (méthode officielle) dans la prise d'essai analysée (39,7g)
	Autre Jardiland (même lot que celui du centre loisir)	2 sachets de 50g	1/2 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (50g) 1/2 Négatif (méthode LNR allemand) dans les prises d'essai analysées (germes et support de germination)
	Jardiland (autre lot que celui du centre de loisir)	5 sachets de 50g	3/5 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (50g) 2/5 Négatif (méthode LNR allemand) dans les prises d'essai analysées (germes et support de germination)
Graines à germer Fenugrec bio	Jardiland (lieu d'achat)	6 sachets (50g chacun)	5/6 Négatif (méthode officielle) dans les prises d'essai analysées (50g) 1/6 Négatif (méthode LNR allemand) (germes et support de germination)
	Autre Jardiland (lot différent du premier)	6 sachets (1 lot sachets de 50g chacun)	3/6 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (3x50g) 3/6 Négatif (méthode LNR allemand) dans les prises d'essai analysées (germes et support de germination)
Graines à germer Moutarde blanche	Autre Jardiland	6 sachets (2 lots 3 sachets de 50g chacun)	2/6 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (3x50g) 4/6 Négatif (méthode LNR allemand) dans les prises d'essai analysées (germes et support de germination)
Eau	Centre de loisir	3 L	3/3 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (3L)
Gaspacho	Centre de loisir (briques industrielles non entamées)	4 L	4/4 Négatif (méthode officielle TS ISO 13136) dans les prises d'essai analysées (4X 25mL)

A la date du 5 juillet 2011, la bactérie *E. coli* O104:H4 n'a pu être mise en évidence dans aucune des graines germées ou à germer, analysées en Allemagne (plusieurs centaines d'analyses

réalisées) ou en France. Des analyses sont toujours en cours et se poursuivront sous réserve de disposer d'échantillons de fenugrec du lot potentiellement incriminé. A ce jour, la bactérie a été retrouvée en Allemagne non seulement dans le sachet ayant contenu des graines germées et prélevé dans la poubelle d'un patient, mais aussi dans divers aliments retrouvés dans le frigo de patients, laissant penser à une contamination par le patient lui-même.

- Procédés de production de graines germées et à germer

Etant donné qu'une très faible quantité de STEC pathogènes est suffisante pour provoquer l'infection humaine, toute survie ou croissance dans le milieu environnemental peut avoir des conséquences importantes en termes de santé publique. La consommation de végétaux crus a déjà été largement décrite comme un des modes de contamination humaine par les STEC (NACMCF 1999). Les pousses de luzerne ou encore les pousses de radis blancs ont été particulièrement mises en cause (Taormina, Beuchat et al. 1999; Breuer, Benkel et al. 2001).

Les graines germées ont été identifiées comme un problème particulier en raison du potentiel de croissance des pathogènes durant le processus de germination. Si les agents pathogènes sont présents sur ou dans les semences, les conditions de germination peuvent favoriser leur prolifération. Il est donc essentiel que ce danger soit pris en compte à chaque étape de la chaîne alimentaire, depuis le producteur de graines à germer et/ ou de graines germées jusqu'au distributeur qui assure la vente au consommateur pour réduire à un niveau acceptable le risque de contamination humaine.

Les graines germées peuvent être contaminées pendant leur germination par plusieurs sources et notamment par une eau d'irrigation de qualité insuffisante, par les bactéries présentes dans le sol, par contact avec des fertilisants organiques contaminés. *E. coli* peut en effet persister très longtemps dans l'environnement.

Des travaux antérieurs ont montré qu'*E. coli* O157:H7 pouvait survivre dans l'eau de boisson et/ou l'eau de baignade pendant plusieurs semaines et plus particulièrement à températures froides. De plus, après 3 mois dans ce milieu, ces bactéries peuvent évoluer vers des formes viables non cultivables (Wang and Reeves 1998). Des épidémies à O157:H7 impliquant une possible contamination par une source hydrique (les eaux de surfaces, les eaux profondes ou encore les eaux de rivière) ont été décrites (Afssa 2003).

Par ailleurs, *E. coli* peut persister jusqu'à plusieurs mois sur ou dans les sols, selon leur nature<sup>9</sup>, ainsi que dans les effluents organiques (fumiers, lisiers, boues de station d'épuration, eaux usées, etc.) (Maule 2000; Afssa 2003; Islam, Doyle et al. 2004; Loukiadis, Kerouredan et al. 2006).

Les graines sont généralement contaminées au niveau des téguments et/ou en surface de l'embryon. Il convient de souligner la difficulté potentielle de détacher les bactéries de la surface des graines, une fois celles-ci contaminées, notamment du fait de l'existence d'un éventuel biofilm à la surface de ces graines. En effet, des biofilms contenant des bâtonnets et des coques ont été observés sur des graines de luzerne (Matos, Garland et al. 2002), et sont par ailleurs communs sur des graines de haricot contaminées par des phytopathogènes. La présence éventuelle d'*E. coli* dans ces biofilms potentiellement protecteurs de la bactérie vis-à-vis des stress environnementaux n'est pas documentée. Des possibilités de contamination de tissus végétaux en profondeur sont suspectées. Elles n'ont toutefois été démontrées qu'expérimentalement (Solomon, Yaron et al. 2002; FAO/WHO 2008).

Les voies de contamination des graines sont variées (voie florale, voie vasculaire, contact avec les tissus du fruit, avec des débris contaminés lors des opérations de récolte et battage, etc.). Une contamination au cours de la récolte ou de l'écossage est possible ainsi qu'une contamination lors du conditionnement.

---

<sup>9</sup> Thèse universitaire de B. Frémaux, soutenue le 14 décembre 2007, Université Claude Bernard Lyon 1 « *Ecologie des Escherichia coli producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les effluents d'élevage bovins et le sol* »

L'application de mesures de nettoyage - désinfection des graines avant la mise en germination aura pour double effet de diminuer la charge globale de contamination et de diminuer le risque de transfert de contamination entre graines ou débris et poussières de cosses et graines.

Cependant, après cette étape de lavage, une infime quantité résiduelle d'*E. coli* O157:H7 sur les graines peut engendrer par multiplication pendant le transport et le stockage, une forte contamination du produit final, représentant un risque pour la santé humaine (Barak, Whitehand et al. 2002). Aussi, la FDA (pour Food and Drug Administration) a notamment recommandé en 1999, aux producteurs de graines germées, la décontamination des graines avant germination et la recherche de *Salmonella* et de *E. coli* O157:H7 dans l'eau d'irrigation après 48h de germination (Anonymous 1999).

Concernant l'hygiène des surfaces de travail industrielles, les données de la littérature indiquent qu'*E. coli* O157 est sensible et ne persiste pas sur ces surfaces traitées. L'adhésion des EAEC et leur survie sur les surfaces inertes ne sont pas documentées.

En 1997, le National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) a publié un rapport qui dresse un bilan des connaissances concernant les épidémies associées à la consommation de graines germées et identifie les pathogènes principaux à considérer et les pratiques de production les plus à risques (NACMCF 1999). Dans ces conclusions, ce comité a recommandé un renforcement de la formation de toutes les parties intéressées se rapportant à la sécurité microbiologique des graines germées. Ce comité a également souligné la mise en œuvre systématique de bonnes pratiques agricoles pour réduire les risques de contamination microbienne des graines à germer ainsi que de pratiques de nettoyage des semences, de stockage et de manipulation qui minimisent le risque de contamination.

Un guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP « Végétaux crus prêts à l'emploi », rédigé par les professionnels de la filière française et en cours d'expertise au sein de l'Anses, devrait reprendre l'ensemble des points critiques soulignés précédemment et mentionnés dans les documents cités en référence.

#### ■ **Retour d'expérience de l'épisode épidémique – discussions sur les scénarii hypothétiques de contamination**

L'origine de la souche épidémique n'est pas connue à ce jour. Cependant, les caractéristiques de cette souche laissent supposer qu'elle résulte du transfert horizontal d'un phage véhiculant le gène *stx2*, codant pour la toxine Stx2, depuis une bactérie donneuse (probablement un EHEC ou un STEC) vers une bactérie receveuse appartenant au pathovar EAEC, qui est ainsi devenue plus pathogène (Brzuszkiewicz, Thurmer et al. 2011).

L'acquisition de ce phage par cet EAEC a pu se dérouler dans différentes conditions : vraisemblablement dans un tube digestif humain ou animal, mais également dans le milieu extérieur (boue de station d'épuration, eaux usées, fumier, lisier, etc.). Il n'est pas possible à ce jour de confirmer ou infirmer ces différentes hypothèses même si la survenue de cet événement est plus vraisemblable dans un milieu où les bactéries peuvent être dans un état physiologique propice à l'activité cellulaire (présence de nutriments, d'humidité et de chaleur) et facilitant les brassages génétiques. A contrario, la possibilité d'un transfert horizontal apparaît peu probable au niveau des graines elles-mêmes.

Plus généralement, il est légitime de s'interroger sur l'émergence d'un clone particulièrement virulent, à l'instar de l'émergence des EHEC dans les années 1980. En effet, à ce jour, il n'est pas possible de savoir si l'épisode est un épiphénomène ou si un nouveau pathotype particulièrement virulent vient d'émerger.

Dès lors, il apparaît nécessaire de vérifier si un nouveau réservoir (humain, animal, environnemental ou alimentaire) émerge. A cette fin, deux pistes pourraient être suivies :

- Etudier la rencontre entre les gènes de virulence de la souche et les facteurs entéroaggrégants : notamment via des criblages PCR des différents marqueurs génétiques ;

- Acquérir des connaissances sur la genèse des pathovars d'*E. coli*, afin de mettre en place des outils permettant de les détecter.

A ce jour, quelle que soit la genèse de cette souche, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la survenue de cet épisode épidémique français au regard de l'épisode allemand précédent.

La contamination des graines germées peut être intervenue à différents stades :

- à la production des graines à germer ;
- au conditionnement / reconditionnement ;
- lors de la germination ;
- lors de la récolte des graines germées et/ou leur préparation pour consommation.

Lors de l'épisode épidémique allemand, plusieurs hypothèses de contamination ont pu être émises initialement : la contamination des graines germées a eu lieu via un porteur sain et/ou via l'eau utilisée, au sein de la ferme Allemande située en Basse – Saxe; ou bien la contamination était préexistante sur les graines à germer importées (contamination des matières premières).

Au regard de la localisation géographique d'exposition, très localisée dans le nord de l'Allemagne, l'hypothèse d'une contamination locale à la ferme pouvait être privilégiée d'autant que le pic épidémique était très distinct dans le temps.

Depuis la survenue de l'épisode bordelais, impliquant cette même souche rare dans un laps de temps très court, l'hypothèse d'une contamination des matières premières est privilégiée. Cependant, l'absence de déclaration de cas, survenue en France avant le foyer bordelais, entre la date de distribution du lot suspecté sur le territoire national (200 sites de vente) et aujourd'hui, modère cette hypothèse.

L'existence d'un éventuel facteur humain (personne exposée en Allemagne, porteur sain et qui aurait contaminé les graines germées au CLPE de Bègles, avant, pendant et/ou après la germination) était une hypothèse envisageable quoiqu'improbable, mais elle a été infirmée par l'enquête épidémiologique.

Par ailleurs, l'existence d'épisodes épidémiques en 2011 en lien avec des lots de graines à germer récoltés plus d'un an avant, suppose la survie particulièrement longue de ces bactéries pathogènes, dans un environnement sec. Peu de travaux publiés décrivent la survie d'*E. coli* sur des graines. Par exemple, la population d'*Escherichia coli* O157:H7, artificiellement inoculée sur des graines d'alfalfa destinées à la production de graines germées, était divisée d'un facteur environ 100 après 6 mois à 25 °C pour une activité de l'eau de 0,15. Le déclin de la bactérie étant plus important pour des températures ou des activités de l'eau plus élevées (Beuchat and Scouten 2002). La présence d'*E. coli* sur des graines stockées plus d'un an reste hypothétique et serait vraisemblablement influencée par le niveau de contamination initiale. Néanmoins, les capacités de survie de la souche O104:H4 considérée dans les conditions de stockage des graines sont inconnues pour l'instant. D'autres entérobactéries pathogènes comme *Salmonella* pourraient survivre un an sur des graines d'alfalfa avec une perte de viabilité d'un facteur 10 seulement (Beuchat and Scouten 2002).

A noter que la piste de contamination via le sachet peut être écartée, le matériau d'emballage ayant fait l'objet d'analyses par le LNR français.

**En l'état actuel des connaissances disponibles, la voie la plus probable d'introduction d'*E. coli* O104:H4 dans la chaîne alimentaire semble être la contamination de graines à germer de fenugrec bio lors de leur production ou de leur conditionnement en Egypte.** Des investigations seraient cependant nécessaires pour affiner les différents scénarios envisageables de contamination des graines avant germination et des germes eux mêmes :

- l'hypothèse d'une contamination en Egypte, durant la production:

La souche épidémique présente un fond génétique d'EAEC, à priori circulant dans cette région du monde. Une estimation de la fréquence de portage asymptomatique de ces EAEC de sérotype O104:H4 en Egypte serait très informative.

Ce scénario de contamination suppose la survie de la bactérie pathogène sur une matrice à faible  $a_w$  (activité de l'eau) pendant une période prolongée. Cette survie peut être facilitée par l'existence d'un biofilm protecteur à la surface des graines. Cette persistance peut être également d'autant plus longue que la charge initiale de contamination est élevée.

Les premiers résultats de l'étude européenne de traçabilité ne permettent pas d'expliquer à ce jour l'absence de survenue d'autre épisode épidémique en Europe.

Des informations complémentaires de la part des autorités égyptiennes, permettant de mieux évaluer les conditions de fabrication des lots de graines à germer en Egypte seraient utiles.

La réalisation de prélèvements et d'analyses au stade de la production (eau d'irrigation, produits finis, porteurs sains, sols, fumure organique), chez l'opérateur identifié par l'étude de traçabilité européenne, en vu d'analyses bactériologiques pourrait apporter des informations précieuses. Elle interviendrait cependant plus de 20 mois après l'importation du lot en Europe. La collaboration de scientifiques européens pour aider les opérateurs et gestionnaires locaux dans leur analyse de la situation et la réalisation des prélèvements et des tests peut être proposée.

Un renforcement des contrôles par lot, à l'importation de graines venant de pays où la fréquence d'EAEC est supposée ou connue comme étant élevée, pour rechercher *E. coli* O104:H4, est recommandé dans l'attente d'une meilleure compréhension de la situation.

- l'hypothèse d'une contamination en Allemagne, lors du reconditionnement :

Cette hypothèse est moins probable que la précédente mais les opérations éventuelles de déconditionnement / reconditionnement chez le grossiste importateur devraient être investiguées afin d'évaluer les risques de contamination croisée lors de ces opérations.

- l'hypothèse de la contamination des germes lors de la germination des graines ou de leur préparation au CLPE de Bègles par un porteur asymptomatique ayant voyagé en Allemagne du nord :

A ce jour, ce scénario est le moins probable. Les investigations conduites auprès du personnel ayant manipulé les germes n'ont pas permis d'étayer cette hypothèse.

#### ■ **Recommandations et axes de recherche à investiguer.**

- Concernant la souche impliquée

Il apparaît utile de :

- Générer des données concernant ses capacités de survie dans les semences, ainsi que d'adhésion sur des surfaces (selon l'environnement et la nature du matériau à considérer). En particulier, investiguer la possibilité d'existence de biofilms à la surface des graines et leur rôle dans la survie d'*E. coli* ;
- Générer des données concernant l'impact de procédés de nettoyage/désinfection sur cette souche spécifique, notamment sur des graines germées ou à germer, en prenant en considération les contraintes des produits issus de l'agriculture biologique ;
- Harmoniser les méthodes de détection au niveau européen, et attirer l'attention des utilisateurs sur l'importance de disposer d'une information précise sur les amorces et les sondes utilisées dans les kits de détection commercialisés, pour s'assurer de leur adéquation avec les recommandations du laboratoire de référence européen ;
- Investiguer les méthodes de macération des graines en préalable à l'analyse microbiologique proprement dite, utilisées par les phytopathologistes pour la revivification des bactéries phytopathogènes ;
- Générer des données concernant la virulence d'*E. coli* résistants aux antibiotiques (type BLSE), d'origine humaine, animale, alimentaire ou environnementale ;
- Générer des données concernant la résistance aux antibiotiques des souches porteuses de gènes de virulence, d'origine humaine, animale, alimentaire ou environnementale ;
- Obtenir des données de prévalence de ces souches entéroaggrégatives et productrices de Shiga-toxines, dans différents réservoirs et pays ;

- Mener des études afin de définir les modalités et les mécanismes d'infection d'une souche EAEC par un phage « *stx* ».

- Concernant l'investigation de l'épisode bordelais

Il serait utile de :

- Disposer de résultats d'analyses de l'environnement de production des graines ;
- Obtenir des renseignements sur les conditions de fertilisation sur les lieux de production des graines, sur les conditions d'ensachage, d'écossage, de récolte, de transport (import/export, types de sacs et taille), de stockage (présence de rongeurs ?) et de reconditionnement ;
- Disposer d'analyses réalisées sur des échantillons prélevés en quantité suffisante (cf. partie « méthodes ») et issus des lots incriminés.

- Concernant la spécificité des populations humaines atteintes lors de ces épisodes épidémiques

Il s'avère souhaitable de :

- Obtenir des explications/pistes possibles expliquant la spécificité de la population touchée (adultes majoritairement des femmes) : facteurs génétiques, exposition alimentaire différente (exploitation/acquisition de données).

- Concernant les pratiques de germination en conditions industrielles

Il s'avère souhaitable de :

- Evaluer l'impact des procédés de germination mis en œuvre, et notamment l'effet de la température, sur la survie et multiplication des STEC pathogènes, lors de la germination en condition industrielle ;
- Evaluer l'efficacité des mesures de nettoyage et désinfection appliquées sur les surfaces et sur les matières premières, vis-à-vis de ces souches entéroaggrégatives et/ou productrices de shigatoxines, au regard des éléments soulignés dans l'avis ;
- Développer les méthodes de détection de STEC pathogènes présentes dans les graines, ou durant le procédé de germination pour optimiser le contrôle des lots.

- Concernant la consommation des graines germées

Compte tenu des conclusions de l'enquête de traçabilité coordonnée par l'EFSA et des résultats de l'enquête épidémiologique, il est important de conseiller à ce stade aux consommateurs de ne pas cultiver de germes pour leur propre consommation, ni de manger de germes ou de graines germées sans les avoir cuits à haute température (70°C, 2 min.). En effet, les graines vendues dans le but d'être consommées germées sont souvent conditionnées sous forme de mélanges de graines et une contamination croisée ne peut être exclue à ce jour. Cette recommandation pourra être revue à la sortie de l'épisode épidémique (soit environ 30 jours après la survenue du dernier cas), à la lumière des connaissances acquises.

L'hygiène personnelle et collective reste la base de la prévention. Il faut notamment insister sur un lavage soigneux des mains après être allé aux toilettes, mais aussi avant la préparation et la prise des repas. Ces recommandations générales d'hygiène sont essentielles pour éviter les cas dits « secondaires », résultant d'un contact direct ou indirect entre un malade et ses proches. L'excrétion fécale de ces bactéries pathogènes par les personnes malades peut se prolonger après l'arrêt des symptômes. Des recommandations détaillées visant à prévenir la transmission des infections à *E. coli* producteurs de shigatoxines sont disponibles sur les sites Internet de l'Institut de veille sanitaire<sup>10</sup> et de l'ECDC (pour European Centre for Disease Prevention and Control)<sup>11</sup>.

<sup>10</sup> <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Syndrome-hemolytique-et-uremique/Actualites/Cas-groupes-de-syndrome-hemolytique-et-uremique-SHU-Nord-juin-2011-Point-au-5-juillet-2011>, consulté le 6 juillet 2011.

Il conviendra par ailleurs, à plus long terme, de se pencher sur les risques sanitaires liés à la consommation de graines germées, dont la germination est réalisée par les particuliers, notamment en évaluant le taux de croissance d'*E. coli* pathogènes éventuellement présents sur/dans les graines à germer, en fonction des différentes modalités précisées sur les sachets de graines ou plus généralement dans des conditions raisonnablement prévisibles.

Il conviendra également d'attirer l'attention du consommateur sur l'importance de l'application des mesures d'hygiène dans le cadre de cette pratique à domicile (nettoyage/désinfection minutieux des germoirs notamment, lavage des mains avant et après manipulation des graines et des germes).

## **5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

Tels sont les éléments que l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est en mesure de fournir, consécutivement à la survenue de plusieurs cas de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) observés en France (région bordelaise) en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

## **MOTS-CLES**

**Mots clés :**

*E. coli* pathogènes, shigatoxines, syndrome hémolytique et urémique (SHU), Graines à germer, Graines germées, semences.

---

<sup>11</sup> [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia\\_coli/prevention\\_measures/Pages/prevention\\_measures.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/prevention_measures/Pages/prevention_measures.aspx) , consulté le 6 juillet 2011.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Afssa (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC).
- Afssa (2010). Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008.
- Anonymous (1999). "Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production." Fed. Reg. 64, 57893-57902.
- Bae, W. K., Y. K. Lee, et al. (2006). "A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4." Yonsei Med J **47**(3): 437-439.
- Barak, J. D., L. C. Whitehand, et al. (2002). "Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts." Appl Environ Microbiol **68**(10): 4758-4763.
- Bernier, C., P. Gounon, et al. (2002). "Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family." Infect Immun **70**(8): 4302-4311.
- Beuchat, L. R. and A. J. Scouten (2002). "Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds." J Appl Microbiol **92**(3): 382-395.
- Bielaszewska, M., A. Mellmann, et al. (2011). "Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study." Lancet Infect Dis.
- Breuer, T., D. H. Benkel, et al. (2001). "A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds." Emerg Infect Dis **7**(6): 977-982.
- Brzuszkiewicz, E., A. Thurmer, et al. (2011). "Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC)." Arch Microbiol.
- Darrasse, A., A. Darsonval, et al. (2010). "Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence." Appl Environ Microbiol **76**(20): 6787-6796.
- FAO/WHO (2008). " [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report." Microbiological Risk Assessment. Rome **Series No. 14.** : 151pp.
- Feng, P., S. D. Weagant, et al. (2001). "Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis." J Clin Microbiol **39**(1): 24-28.
- Gault G, W. F., Mariani-Kurkdjian , Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Macé M, Bingen E, Noël H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigné E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P. (2011). "Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011." Euro Surveill. **16**(26):pii=19905.

- Islam, M., M. P. Doyle, et al. (2004). "Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water." *J Food Prot* **67**(7): 1365-1370.
- Kirchner, M., H. Wearing, et al. (2011). "Characterization of Plasmids Encoding Cefotaximases Group 1 Enzymes in *Escherichia coli* Recovered from Cattle in England and Wales." *Microb Drug Resist.*
- Liao, C. H. and W. F. Fett (2003). "Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in seed homogenates." *Int J Food Microbiol* **82**(3): 245-253.
- Loukiadis, E., M. Kerouredan, et al. (2006). "Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France." *Appl Environ Microbiol* **72**(5): 3245-3251.
- Madec, J. Y., B. Doublet, et al. (2011). "Extended-spectrum beta-lactamase blaCTX-M-1 gene carried on an IncI1 plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France." *J Antimicrob Chemother* **66**(4): 942-944.
- Matos, A., J. L. Garland, et al. (2002). "Composition and physiological profiling of sprout-associated microbial communities." *J Food Prot* **65**(12): 1903-1908.
- Maude, R. B. (1996). "Seedborne diseases and their control: principles & practice." CAB International, Oxon, United Kingdom.
- Maule, A. (2000). "Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces." *Symp Ser Soc Appl Microbiol*(29): 71S-78S.
- Mellmann, A., M. Bielaszewska, et al. (2008). "Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Emerg Infect Dis* **14**(8): 1287-1290.
- Morabito, S., H. Karch, et al. (1998). "Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome." *J Clin Microbiol* **36**(3): 840-842.
- NACMCF (1999). "Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods." *Int J Food Microbiol* **52**: 123-153.
- Scheutz, F., E. Moller Nielsen, et al. (2011). "Characteristics of the enterohemorrhagic Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011." *Euro Surveill* **16**(24).
- Solomon, E. B., S. Yaron, et al. (2002). "Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization." *Appl Environ Microbiol* **68**(1): 397-400.
- Taormina, P. J., L. R. Beuchat, et al. (1999). "Infections associated with eating seed sprouts: an international concern." *Emerg Infect Dis* **5**(5): 626-634.
- Wang, L. and P. R. Reeves (1998). "Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes." *Infect Immun* **66**(8): 3545-3551.
- Weill, F. X., J. D. Perrier-Gros-Claude, et al. (2004). "Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal." *FEMS Microbiol Lett* **238**(2): 353-358.