



### **ADVIES 15-2012**

**Betreft: Preventie, detectie, snelle tracering en beheersing van uitbraken van humaan pathogene Verotoxine-producerende *Escherichia coli* in de voedselketen (dossier Sci Com 2011/18: eigen initiatief).**

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 20 april 2012.

### **Samenvatting**

Gezien de ernst van de uitbraak van *Escherichia coli* O104:H4 in de lente van 2011 in Duitsland en de daaraan gerelateerde cluster in Frankrijk, geeft het Wetenschappelijk Comité advies over de preventie, detectie, snelle tracering en beheersing van uitbraken van humaan pathogene Vero(cyto)toxine-producerende *Escherichia coli* (VTEC) in de voedselketen.

Humaan pathogene VTEC die op dit ogenblik gekend en erkend zijn als belangrijk voor het veroorzaken van ziekte bevatten genen voor de productie van Verotoxines (*stx*- of *vtx*-genen) en kunnen een combinatie van de volgende virulentiefactoren bevatten: genen voor aanhechting in de darm (vb. *eae*-gen, *saa*-gen, *lpf*-gen), genen coderend voor andere adhesiefactoren (vb. 'Aggregative Adherence Fimbriae'), en hun regulatoren. Het *ehx*-gen dat codeert voor enterohemolysine wordt soms aangetroffen bij humaan pathogene VTEC.

Levensmiddelen worden gescreend via cultuur en moleculaire technieken zoals PCR, welke voornamelijk gericht zijn op de detectie van *stx*-genen en het *eae*-gen. Bij positieve resultaten wordt er sterk aanbevolen om de stammen op te pikken via immunocapture en/of (chromogene) selectieve isolatiemedia om nadien de aanwezigheid van de bovenvermelde virulentiegenen in afzonderlijke bacteriële kolonies te bevestigen. Bevestiging via isolatie van de stam is noodzakelijk aangezien de moleculaire detectie van een combinatie van virulentiegenen in levensmiddelen niet uitsluit dat de virulentiegenen in verschillende *E. coli*-stammen aanwezig zijn die elk afzonderlijk niet of weinig pathogeen zijn voor de mens.

De volgende levensmiddelen zijn risicoproducten voor humaan pathogene VTEC: rauwe (of onvoldoende verhitte) melk en zuivelproducten op basis van rauwe (of onvoldoende verhitte) melk, rauw (of onvoldoende verhit) rundvlees of vlees afkomstig van andere (kleine) herkauwers, verse blad- en vruchtgroenten, kiemgroenten, verse aromatische (tuin)kruiden, zacht rood fruit en voorversneden en voorverpakte groenten, fruit en granen van het vierde gamma.

Het Wetenschappelijk Comité heeft geen directe wetenschappelijke basis om het controleprogramma van het FAVV in 2012 verder uit te breiden naar het opsporen van andere VTEC-serogroepen ten opzichte van de serogroepen onderzocht in 2011. Er wordt wel

aanbevolen om het controleprogramma jaarlijks te evalueren met betrekking tot humaan pathogene VTEC in functie van de kennis over circulerende humaan pathogene seropathotypes, om controles uit te voeren op de beheersing van fecale besmetting via analyse van *E. coli*, in parallel met controles op VTEC en om naast de screening op de aanwezigheid van *stx*-genen en het *eae*-gen en op de prioritaire VTEC-serogroepen ook aandacht te hebben voor de aanwezigheid van de combinatie van relevante virulentiefactoren en dit op suggestie van het Nationaal Referentielaboratorium (NRL) voor VTEC, het Europees Referentielaboratorium (EU-RL) voor VTEC of andere deskundige onderzoeksgroepen.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan dat het FAVV toeziet op het gebruik van goede hygiënische werkpraktijken zowel tijdens de dierlijke productie als tijdens de plantaardige productie. De persoonlijke hygiëne en vooral de handhygiëne van het personeel dat actief is in alle stadia van de voedselketen dient benadrukt te worden. De sectorgids voor de primaire productie en de sectorgids voor de aardappelen-, groenten- en fruitverwerkende industrie dient uitgebreid te worden met specifieke aanbevelingen voor risicovolle producten zoals bladgroenten, verse tuinkruiden en kiemgroenten. Op het niveau van de primaire plantaardige productie en verwerking dient voldoende begeleiding en informatie voorzien te worden met betrekking tot de microbiologische gevaren en de mogelijke transmissieroutes naar de mens. Het gebruik van water met een voldoende microbiologische kwaliteit moet een bijzonder punt van aandacht zijn.

In de medische sector is er nood aan goede communicatie tussen klinische laboratoria onderling en een snelle en efficiënte centrale rapportering van gevallen van het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) bij de mens, ook voor wat betreft de karakteristieken van de isolaten (virulentie, serogroep, ...). Alle gevallen van bloederige diarree en HUS moeten onderzocht worden aan de hand van microbiologische diagnose en bijgevolg moeten alle middelen die dit mogelijk maken ter beschikking gesteld worden aan de medische sector. Daarnaast is er nood aan een goede interactie en coördinatie en een adequate uitwisseling van informatie tussen de diverse nationale en Europese referentielaboratoria voor de analyse van VTEC in stalen afkomstig van mensen, dieren en voedsel. Het Wetenschappelijk Comité ondersteunt ten sterkste het continu actualiseren en verifiëren van een afdoende crisis- en communicatieplan zodat alle betrokken partijen snel en gepast en in overleg kunnen reageren en communiceren voor het vroegtijdig detecteren van voedselinfecties met humaan pathogene VTEC. Ten slotte is het aangewezen dat het NRL voor VTEC, het EU-RL voor VTEC of andere deskundige onderzoeksgroepen moleculaire technieken ontwikkelen waarmee op een snelle en efficiënte manier culturen en isolaten gescreend kunnen worden op de aanwezigheid van een brede waaier aan virulentiefactoren. Er dient tevens de nodige aandacht besteed te worden aan de ontwikkeling van betere detectiemethoden, vooral in microbiologisch hoog beladen producten, zoals een aangepaste ophopingsstap voorafgaand aan de screening met bijvoorbeeld PCR.

## Summary

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Sleutelwoorden**

*Escherichia coli* – VTEC/STEC – uitbraak – (kiem)groenten – HUS

## 1. Referentietermen

Naar aanleiding van de uitbraak van *Escherichia coli* O104:H4 in de lente van 2011 in Duitsland en de daaraan gerelateerde cluster in Frankrijk, werd dit dossier op eigen initiatief opgestart om aanbevelingen te maken naar diverse betrokken partijen ter preventie, detectie, snelle tracering en beheersing van uitbraken van humaan pathogene Verotoxine-producerende *Escherichia coli* (VTEC) in de voedselketen. Het Wetenschappelijk Comité neemt in dit advies afstand van het acute incident en voert een strategische reflectie uit waarbij de volgende vragen centraal staan:

- Welke virulentiefactoren en combinaties hiervan zijn verantwoordelijk voor de pathogeniciteit van *E. coli* bij de mens en bij welke serotypes kunnen deze virulentiefactoren aanwezig zijn?
- Op basis van welke testen kunnen humaan pathogene VTEC gedetecteerd worden en wat zijn de beperkingen?
- Welke levensmiddelen zijn risicoproducten voor contaminatie met humaan pathogene VTEC?
- In welke mate kan het controleprogramma van het FAVV humaan pathogene VTEC detecteren en kan het autocontrolesysteem VTEC-uitbraken voorkomen?
- Welke bijkomstige beheers- en controlemaatregelen kunnen door het FAVV genomen worden om VTEC-uitbraken te voorkomen?
- Welke aanpak kan gehanteerd worden om te voorkomen dat (onverwachte) VTEC-uitbraken escaleren tot een crisis?

Overwegende de besprekingen tijdens de vergadering van de werkgroep van 16 september 2011 en de plenaire zitting van 20 april 2012;

**geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies:**

## 2. Advies

### **2.1. Welke virulentiefactoren en combinaties hiervan zijn verantwoordelijk voor de pathogeniciteit van *E. coli* bij de mens en bij welke serotypes kunnen deze virulentiefactoren aanwezig zijn?**

Pathogene *E. coli*-stammen kunnen gegroepeerd worden op basis van de combinatie van klinische symptomen en (gekende) virulentiefactoren. De extra-intestinale pathogene *E. coli* omvatten de uropathogene *E. coli* (UPEC), welke verantwoordelijk zijn voor urineweginfecties, en de meningitis-geassocieerde *E. coli* (MAEC), welke meningitis veroorzaken in pasgeborenen. De intestinale pathogene *E. coli* (IPEC) zijn verantwoordelijk voor een reeks van diarreegerelateerde ziekten en syndromen bij de mens en omvatten de enteropathogene *E. coli* (EPEC), de entero-invasieve *E. coli* (EIEC), de enterotoxinogene *E. coli* (ETEC), de entero-aggregatieve *E. coli* (EAEC) en de diffuus adherente *E. coli* (DAEC), welke een humaan reservoir hebben en vooral verspreid worden via de fecaal-orale route, echter zelden via voeding of water. Tevens omvatten ze de Verotoxine-producerende *E. coli* (VTEC) of Shiga-toxine-producerende *E. coli* (STEC), welke een dierlijk reservoir (voornamelijk runderen) hebben en vaak geassocieerd worden met voedselgebonden uitbraken. Echter, heel wat VTEC zijn pathogeen voor dieren en niet zoönotisch. VTEC worden gekenmerkt door hun vermogen om Verotoxines te produceren. De enterohemorragische *E. coli* (EHEC) zijn een subgroep van VTEC en worden geassocieerd met symptomen van hemorrhagische colitis (HC) en het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) (ILSI Europe, 2011). "Typische EHEC" zijn ook positief voor het zogenaamde *eae*-gen.

Een strikte scheiding tussen de groepen is er echter niet en nieuwe combinaties van virulentiefactoren kunnen op elk moment ontstaan na verwerving of verlies van mobiele genetische elementen die geassocieerd zijn met deze virulentiegenen. Sommige EPEC zijn bijvoorbeeld nauw verwant met *eae*-positieve VTEC, vooral door de overeenkomst in de serotypes en de homologie van het *eae*-gen. Het is mogelijk dat EPEC *stx*-genen opnemen door bacteriofaagtransductie en op die manier kunnen ze HUS veroorzaken bij de mens. Per definitie zijn dergelijke stammen geen EPEC meer, echter wel VTEC. Eveneens de EAEC kunnen *stx*-genen opnemen. Bijvoorbeeld, de uitbraakstam *E. coli* O104:H4 betrof een EAEC die na opname van het *stx*-gen als een EAEC-VTEC kon gegroepeerd worden. Dit maakt de complexiteit duidelijk van de groepering van pathogene *E. coli*-stammen.

**VTEC** produceren toxines, Verocytotoxines (*vtx*) of Shiga-toxines (*stx*) genaamd, die lethaal zijn voor Verocellen (niercellen van een Afrikaanse apensoort). Gezien de *stx*-genen zich in bacteriofagen bevinden, kunnen ze getransfereerd worden tussen verschillende *E. coli*-stammen via bacteriofaagtransductie (Herold *et al.*, 2004). Er bestaan meer dan 400 serotypes van VTEC, welke in verschillende seropathotypes kunnen worden ingedeeld (Karmali *et al.*, 2003). Deze classificatie gebeurt op basis van de relatieve incidentie, de frequentie van de betrokkenheid in uitbraken en de associatie met ernstige ziekten zoals HUS of HC. In tabel 1 wordt de classificatie van VTEC-serotypes in seropathotypes weergegeven. Alle seropathotypes zijn *stx*-positief, sommige zijn eveneens *eae*-positief (vb. seropathotypes A en B). Deze laatste produceren het adhesine intimine en veroorzaken vaak HC en/of HUS. Alle seropathotypes kunnen geassocieerd worden met diarree. Wegens zijn lage relatieve incidentie, het ontbreken van voorafgaande epidemieën en zijn associatie met HUS tijdens de uitbraak in Duitsland, zou de uitbraakstam *E. coli* O104:H4 tot het seropathotype C kunnen behoren. Daarnaast zou dit serotype als een afzonderlijk seropathotype kunnen beschouwd worden, gezien zijn associatie met entero-aggregatieve adhesie.

**Tabel 1. Classificatie van VTEC-serotypes in seropathotypes.**  
(bron: Karmali *et al.*, 2003)

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

<sup>a</sup> HUS or hemorrhagic colitis.

<sup>b</sup> NA, not applicable.

VTEC kunnen voorkomen bij mens en dier en kunnen beide pathogeen zijn. De klassieke VTEC O157, O26, O103, O111 en O145 (= 'gang of five') worden gedefinieerd als zoönotische bacteriën met een reservoir bij landbouwhuisdieren. Humaan pathogene VTEC-stammen kunnen, na opname door de mens, ziekte (bloederige diarree, HC en/of het ernstiger HUS) veroorzaken. De combinatie van de genetische factoren die ervoor zorgen dat een VTEC HC of HUS kan veroorzaken is onbekend. Tot op heden is er nog steeds onvoldoende inzicht in de exacte mechanismen van de pathogeniciteit van VTEC en de daarbij betrokken virulentiefactoren en hun regulatoren. VTEC kunnen de mens besmetten via gecontamineerd voedsel en gezien de lage infectieuze dosis eveneens via direct contact van de mens met dieren (vb. bezoek aan kinderboerderij) of via direct contact met besmette personen.

**EAEC** werden tot nu toe uitsluitend geassocieerd met humane infecties en zijn tot op heden nog weinig gekend. Over de verspreiding van EAEC in de voedselketen is weinig informatie beschikbaar, echter een aantal studies tonen aan dat dergelijke stammen niet afkomstig zijn van dieren of levensmiddelen (Cassar *et al.*, 2004; Uber *et al.*, 2006). Ze komen vooral voor bij de mens in ontwikkelingslanden en zijn gekend als oorzaak van reizigersdiarree. Levensmiddelen, geïmporteerd uit deze landen, kunnen gecontamineerd zijn ten gevolge van manipulatie door werknemers (al dan niet met symptomen van diarree) met onvoldoende persoonlijke hygiëne en die drager zijn van de kiem. Hoewel EAEC een humaan reservoir hebben, kunnen ze via een dergelijke transfer van de mens naar levensmiddelen voedselgebonden uitbraken veroorzaken. EAEC bevatten een of meerdere adhesiefactoren

zoals 'Aggregative Adherence Fimbriae', gecodeerd door *aaf*-genen, en het *aggR*-gen (regulatorgen voor aggregatieve adhesie).

**De uitbraakstam *E. coli* O104:H4** veroorzaakte HC en HUS, heeft waarschijnlijk een humaan reservoir van waaruit de voedselketen besmet werd en kan tevens secundaire gevallen veroorzaken door overdracht van mens op mens. De stam wordt aangeduid als een entero-aggregatieve enterohemorragische *E. coli* (EAHEC), een EAEC-VTEC of een AggVTEC (Piérard *et al.*, 2012), aangezien de stam enerzijds genen heeft die typerend zijn voor EAEC en anderzijds genen die typerend zijn voor VTEC. Op basis van de sequencerij van het totale genoom van de epidemische stam (93 % gelijkheid met het totale genoom van de EAEC 55989-stam), is duidelijk aangetoond dat het gaat om een nieuwe stam van *E. coli* die pathogeen is voor de mens. Het gaat om een EAEC-stam met een sterk aanhechtingsvermogen die via horizontale overdracht het *stx2*-gen verworven heeft dat hem het vermogen verschaft om een toxine te produceren dat hem virulent maakt. Deze combinatie van virulentiefactoren van verschillende pathogene types wijst op optreden van laterale of horizontale gentransfer bij *E. coli* en de dynamiek van het voorkomen van virulentiefactoren (Mellmann *et al.*, 2009) en werd reeds gerapporteerd bij zeldzame stammen van dit serotype (Scheutz *et al.*, 2011), alsook bij O111:H2 (Morabito *et al.*, 1998) en O86:HNM (Iyoda *et al.*, 2000), welke humane infecties met symptomen van HC en HUS veroorzaakten. Het serotype *E. coli* O104:H4 wordt niet courant geassocieerd met humane ziekte. In het verleden werden slechts sporadische gevallen van *E. coli* O104:H4 gerapporteerd: Duitsland (2001), Frankrijk (2004), Georgië (2009) en Finland (2010). Tot nu toe was deze stam nog nooit in verband gebracht met een dergelijke belangrijke epidemie zoals waargenomen in Duitsland en Frankrijk in 2011 (Jourdan-da Silva *et al.*, 2011). Bijgevolg is er bijna geen informatie over de epidemiologie van deze stam en kan men zich enkel baseren op de epidemiologie van EAEC om naar analogie een idee te krijgen over deze zogenaamde EAEC-VTEC.

De uitbraakstam wordt gekenmerkt door de volgende karakteristieken (EFSA, 2011):

- *stx1*-gen niet aanwezig
- *stx2a*-gen aanwezig
- *eae*-gen (intimine) niet aanwezig
- *ehx*-gen (enterohemolysine) niet aanwezig
- EAEC-virulentieplasmide aanwezig
- *aafA*-gen ('Aggregative Adherence Fimbriae' type 1) aanwezig
- *aggR*-gen (regulator voor aggregatieve adhesie) aanwezig
- multi-locus sequence type (MLST): ST678
- plasmide aanwezig met antibioticumresistentiegenen (*bla<sub>CTX-M-15</sub>*-gen en *bla<sub>TEM-1</sub>*-gen)
- antimicrobieel resistentieprofiel: ampicilline, amoxicilline, cefuroxime, cefoxitine, cefotaxime, ceftazidime, cefpodoxime, streptomycine, nalidixinezuur, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, piperacilline en cefuroxime-axetil. De rol van de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen in het pathogeen karakter van de stam is onduidelijk.

De serogroep O104 op zich geeft niet voldoende informatie omtrent de pathogeniciteit van de stam, aangezien deze laatste hoofdzakelijk wordt bepaald door de aanwezigheid van bepaalde virulentiefactoren. De humaan pathogene VTEC in de voedselketen die op dit ogenblik gekend zijn als belangrijk voor het veroorzaken van ziekte, worden gekenmerkt door genen voor de productie van Verotoxines (*stx*-genen), genen voor aanhechting in de darm (vb. *eae*-gen, *saa*-gen, *lpf*-gen) of genen die coderen voor andere adhesiefactoren ('Aggregative Adherence Fimbriae'), en hun regulatoren. De productie van toxines is noodzakelijk maar niet voldoende om HUS te veroorzaken. De productie van intimine (gecodeerd door het *eae*-gen) en de daaropvolgende lesie zorgt voor een inflammatoire reactie in de darm. Vervolgens ontstaat diarree en indien er meer toxines geproduceerd worden, ontstaat bloederige diarree. Het *eae*-gen kan vervangen worden door andere aanhechtingsfactoren, waarbij het theoretisch gezien mogelijk is dat hetzelfde effect optreedt. Een andere factor die bijdraagt tot (ernstige) infecties is het enterohemolysine, gecodeerd door het *ehx*-gen (plasmidegebonden), dat frequent wordt aangetroffen bij VTEC-stammen van de seropathotypes A en B (zie tabel 1) die betrokken zijn bij klinische gevallen. Enerzijds bestaan er humane stammen van deze seropathotypes die het plasmide met het gen coderend voor enterohemolysine niet dragen. Anderzijds bestaan er VTEC-stammen

geïsoleerd uit levensmiddelen of dieren, die het *ehx*-gen wel dragen en niet humaan pathogeen zijn. De betrokkenheid van het *ehx*-gen en het plasmide, dat dit gen draagt, bij pathogeniciteit van VTEC is nog onvoldoende ontrafeld (Bugarel *et al.*, 2010 (b)). Het volledige spectrum van mogelijke en noodzakelijke virulentiefactoren (of hun varianten) en hun regulatormechanismen zijn tot op heden onvoldoende gekend en verder onderzoek daaromtrent blijft aanbevolen.

In het algemeen wordt de virulentie van pathogene bacteriën veranderd door het verkrijgen van mobiele genetische elementen zoals bacteriofagen, transposons, plasmiden en genomische eilanden. De genomische eilanden omvatten de klasse van de 'pathogeniciteitseilanden', welke virulentiegenen dragen verantwoordelijk voor infectie van de gastheer. Deze pathogeniciteitseilanden bestaan uit een exogene combinatie van mobiliseerbare genen die bijdragen tot het pathogeen vermogen van de stam die ze draagt. Ze zijn een indicator voor een pathogene stam. Een pathogeniciteitseiland van VTEC-stammen, het LEE-pathogeniciteitseiland, is drager van genen die coderen voor type III-effectoren die een rol spelen in de virulentie van VTEC-stammen. Het LEE-pathogeniciteitseiland is ook drager van het *eae*-gen. Vele andere van deze eilanden met de naam OI-36, OI-43, OI-48, OI-71, OI-115, IO-122, IO-140, IO-141-en IO-154 lijken ook een rol te spelen in de virulentie van verschillende VTEC. De eilanden IO-122 en IO-71 werden bestudeerd door verschillende teams die de stabiliteit van bepaalde genen die behoren tot deze eilanden hebben aangetoond bij pathogene VTEC-stammen (Coombes *et al.*, 2008; Konczyk *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010 (a)). Voor wat betreft de virulentiegenen, bestaan er binnen de *stx1*-, *stx2*- en *eae*-genen veel varianten en de 'typische EHEC' die vooral betrokken zijn bij gevallen van HUS hebben de volgende genetische kenmerken:

- EHEC O157:H7 = *rfb*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *stx1* en/of *stx2*, *eae*-gamma, (OI-122)
- EHEC O145:H28 = *wzx*<sub>O145</sub>, *fliC*<sub>H28</sub>, *stx1* en/of *stx2*, *eae*-gamma, (OI-122)
- EHEC O111:H8 = *wzx*<sub>O111</sub>, *fliC*<sub>H8</sub>, *stx1* en/of *stx2*, *eae*-theta, (OI-122)
- EHEC O103:H2 = *wzx*<sub>O103</sub>, *fliC*<sub>H2</sub>, *stx1* en/of *stx2*, *eae*-epsilon, (OI-122)
- EHEC O26:H11 = *wzx*<sub>O26</sub>, *fliC*<sub>H11</sub>, *stx1* en/of *stx2*, *eae*-beta, (OI-122)

Detectie van het eiland OI-122 bevestigt de virulentie van de stam, echter het ontbreken van detectie bewijst niet noodzakelijk een gebrek aan virulentie. De 'atypische EHEC' (vb. EHEC O91) behorend tot seropathotype C zijn negatief voor *eae* en IO-122.

## **2.2. Op basis van welke testen kunnen humaan pathogene VTEC gedetecteerd worden en wat zijn de beperkingen?**

Levensmiddelen worden gescreend op de aanwezigheid van VTEC (en/of de prioritair VTEC-serotypes) via cultuur en moleculaire technieken zoals PCR, welke voornamelijk gericht zijn op de detectie van *stx*-genen en het *eae*-gen. Bij positieve resultaten wordt er sterk aanbevolen om de stammen op te pikken via immunocapture methoden gericht op specifieke bacteriële oppervlakteantigenen en/of (chromogene) selectieve isolatiemedia (op basis van serotypegebonden biochemische kenmerken) om nadien de aanwezigheid van de bovenvermelde virulentiegenen in afzonderlijke bacteriële kolonies te bevestigen. Alternatief worden eerst de stammen van bepaalde serotypes via (chromogene) selectieve isolatiemedia, al dan niet gecombineerd met immunocapture methoden (i.e. expressie van oppervlakteantigenen) of met PCR (of ELISA) geïsoleerd uit het levensmiddel en worden nadien de gekende virulentiefactoren (*stx*-genen en het *eae*-gen, of andere indien gewenst) in de individuele isolaten van het desbetreffende *E. coli*-serotype bevestigd (zie bijlage 1).

Beide aanpakken van detectie vertonen echter beperkingen. Ten eerste sluit de moleculaire detectie van een combinatie van virulentiegenen in levensmiddelen niet uit dat de virulentiegenen in verschillende *E. coli*-stammen aanwezig zijn die elk afzonderlijk niet of weinig pathogeen zijn voor de mens. Bevestiging via isolatie van de stam is bijgevolg noodzakelijk. De isolatie van de stam blijft ook belangrijk voor de karakterisatie van de stam: analyse van andere mogelijke virulentiefactoren, voor de bepaling van het serotype en van het antibioticumresistentieprofiel, en voor hun moleculaire vergelijking met klinische stammen tijdens uitbraken. Deze informatie is noodzakelijk om de link te leggen tussen de aanwezigheid van de VTEC-stam in het levensmiddel en de humaan klinische stam. Ten tweede wordt de benadering waarbij het gezochte serotype wordt geïsoleerd, bemoeilijkt door de aanwezigheid van competitieve flora in het voedsel (al dan niet andere niet-pathogene *E.*



*coli*-stammen of begeleidende nauw verwante kiemen zoals andere *Enterobacteriaceae* of verzurende melkzuurbacteriën), wat de groei van de pathogene *E. coli*-stammen die in lage aantallen voorkomen, verhindert. Een derde beperking is het feit dat reeds (zeer) lage aantallen dienen opgespoord te worden in levensmiddelen wegens de lage infectieuze dosis. Dit is een belangrijke factor waarmee rekening moet gehouden worden voor zowel moleculaire screeningsmethoden als bevestigingsmethoden gebaseerd op immunocapture of selectieve isolatie. Dit vereist immers goed uitgebalanceerde aanrijkmethode die momenteel nog niet voor alle matrices met voldoende gevoeligheid voorhanden zijn (vb. kiemgroenten). Ten slotte kunnen, hoewel PCR een sterke gevoeligheid heeft, levensmiddelen inhiberende reacties veroorzaken die voor vals negatieve resultaten zorgen.

De meest voorkomende en best bestudeerde VTEC is *E. coli* O157. Deze pathogeen kan routinematig aangetoond worden omdat methoden ontwikkeld werden op basis van zijn serogroep. Het gen dat codeert voor het antigeen O157, kan gedetecteerd worden met PCR. De serogroep kan eveneens gedetecteerd worden via ELISA (gebaseerd op de reactie tussen antigeen en antilichaam). Tevens kunnen de stammen geïsoleerd worden uit het levensmiddel via de antigeen-antilichaam-binding door immunocapture methoden in combinatie met selectieve media. De selectieve media maken gebruik van het feit dat de meeste humane *E. coli* O157 sorbitol-negatief zijn. Omdat ook sorbitol-positieve stammen van *E. coli* O157 zijn gesignaleerd, worden dergelijke isolatiemedia ook gecombineerd met selectieve chromogene isolatiemedia die de differentiatie van *E. coli* O157 toelaten.

Voor de andere serogroepen uit de 'gang of five' werden ook detectiemethoden ontwikkeld, eveneens gebaseerd op PCR-detectie van het gen coderend voor de desbetreffende O-serogroep of via immunocapture methoden. Echter, het ontbreekt hier aan gebruiksvriendelijke en kant-en-klare differentiërende selectieve agarmedia voor de isolatie van deze non-O157-serogroepen, wat de detectiemethoden vrij omslachtig (en vaak onvoldoende gevoelig en specifiek) maakt.

Humaan pathogene VTEC die niet behoren tot de 'gang of five' of alternatieve virulentiefactoren bevatten, kunnen ontsnappen aan de huidige routinematige methoden die gebaseerd zijn op het detecteren van de combinatie van *stx*-genen en het *eae*-gen. Dit was het geval voor de uitbraakstam *E. coli* O104:H4 die negatief was voor het *eae*-gen en bijgevolg was het nodig om een aangepaste isolatie- en detectiemethode te ontwikkelen. Voor dergelijke nieuw opduikende VTEC-stammen is een mogelijks alternatieve aanpak nodig die per gevalstudie ad hoc wordt opgezet op basis van de karakteristieken van de stam (vb. antibioticumresistentieprofiel, specifieke sequenties van de betrokken VTEC-stam) (Beutin, 2011; FAVV, 2011). Het feit dat er onvoldoende informatie beschikbaar is over de identiteit van humaan pathogene VTEC, is beperkend voor het ontwikkelen van een sluitende detectiemethode. Daarom beperken de bewakingsprogramma's zich tot het detecteren van prioritaire doelwitorganismen (bepaalde gekende en erkende serogroepen) waarvoor reeds detectiemethodes voorhanden zijn voor het screenen in de voedselketen.

### **2.3. Welke levensmiddelen zijn risicoproducten voor contaminatie met humaan pathogene VTEC?**

De uitbraak van *E. coli* O104:H4 in Duitsland en Frankrijk in de lente van 2011 werd via epidemiologische tracersing gelinkt aan besmette kiemzaden (EFSA, 2011). De productie van scheuten is een kleine sector en scheuten worden wereldwijd verhandeld. De hoge temperatuur en de vochtige omstandigheden van het productieproces bevorderen de snelle uitgroei van de bacteriën (inclusief pathogene kiemen) indien deze aanwezig zijn op de kiemzaden. Dit verklaart het algemeen hoge kiemgetal van scheuten alsook de mogelijkheid tot verhoogde aantallen aan pathogene kiemen, zelfs indien deze slechts in lage aantallen op de kiemzaden aanwezig waren. Niettegenstaande zaden droog en soms gedurende lange periodes bewaard worden, is vastgesteld dat *E. coli* gedurende lange tijd (meerdere maanden) kunnen overleven op deze kiemzaden (Beuchat & Scouten, 2002; Van der Linden *et al.*, 2011). Aldus vormen gekiemde scheuten omwille van hun mogelijke initiële besmetting met pathogene kiemen, hun productieproces en hun hoofdzakelijk rauwe consumptie, een risicoproduct voor VTEC. Tevens zijn ze al meermaals betrokken geweest bij grootschalige voedseluitbraken (o.a. uitbraak van *E. coli* O157:H7 in Japan in 1996 ten gevolge van de

consumptie van radijsscheuten; minstens 30 uitbraken in de Verenigde Staten en Canada sinds 1996 die gelinkt waren aan de consumptie van scheuten).

Een aantal vragen stelt zich met betrekking tot de productie van kiemgroenten: wordt de microbiologische kwaliteit van de zaden of het water gebruikt tijdens de productie gecontroleerd? Is er een mogelijkheid om de zaden en/of het water te decontamineren? Vormen de substraten die aan het water toegevoegd worden om het kiemen en de groei te bevorderen een risico voor de consument? Kunnen scheuten efficiënt gewassen worden na de oogst met het oog op het reduceren van eventuele microbiële contaminatie (inclusief pathogene kiemen)? In een ruimer verband zou het risico van de productieprocessen van kant-en-klare verse rauwe plantaardige voedingsmiddelen (als krop of als versneden voorverpakt product) met betrekking tot VTEC grondiger moeten geëvalueerd worden. Het is belangrijk dat tijdens het volledige productieproces de aandachtspunten en mogelijke preventieve maatregelen, en indien van toepassing de interventiestappen, geïdentificeerd worden en dat de beheersing ervan gecontroleerd en gedocumenteerd wordt. Dergelijke risico-evaluatie is reeds sterk uitgebouwd voor producten van dierlijke oorsprong maar eerder beperkt voor producten van plantaardige oorsprong. Uit de opzet van dergelijke risico-evaluaties moet blijken of de productieprocessen eventueel dienen aangepast te worden, of hoe ze adequaat beheerst kunnen worden. Het risico op besmetting met pathogene VTEC en op vermenigvuldiging en verspreiding tijdens de productiefase kan op die manier verminderd worden.

Naar analogie met de uitbraak gelinkt aan kiemzaden is het van belang dat men bewust is van de gevaren van andere levensmiddelen die mogelijks aan de basis kunnen liggen van voedseluitbraken ten gevolge van enterische, zoönotische pathogenen zoals VTEC en de *E. coli* O104:H4-stam. De levensmiddelen die beantwoorden aan één of meerdere van de volgende omschrijvingen kunnen mogelijks een risico voor de consument betekenen:

- rauwe/verse producten die kant-en-klaar geconsumeerd worden (zonder een microbiële inactivatiestap in het productieproces of tijdens de bereiding);
- levensmiddelen die mogelijks een nicheproduct zijn (qua omzetvolumes) maar wijd verspreid worden vanuit één lot over een grote regio en die bij een grote diversiteit aan maaltijden eventueel als klein onderdeel (als decoratie of afkruiding) geserveerd worden;
- levensmiddelen of grondstoffen die tijdens de oogst, verwerking of handel veelvuldig met de hand gemanipuleerd worden of door andere bronnen gecontamineerd kunnen worden en die al dan niet geïmporteerd worden uit derde landen waar goede hygiënische praktijken mogelijks minder gekend zijn en minder gecontroleerd worden;
- plantaardige levensmiddelen waarbij ten gevolge van internalisatie van VTEC verwijdering van VTEC via wassen of zelfs decontaminatie niet meer mogelijk is.

De volgende levensmiddelen zijn risicoproducten voor de aanwezigheid van humaan pathogene VTEC:

- rauwe (of onvoldoende verhitte) melk en zuivelproducten op basis van rauwe (of onvoldoende verhitte) melk zoals boter, geitenkaas, halfharde kaas, schapenkaas, verse kaas, zachte kaas en room;
- rauw (of onvoldoende verhit) rundvlees zoals filet américain natuur/préparé of vlees afkomstig van andere (kleine en wilde) herkauwers;
- verse bladgroenten zoals slasoorten en vruchtgroenten zoals tomaten, pepers en komkommer;
- kiemgroenten;
- verse aromatische (tuin)kruiden;
- zacht rood fruit;
- voorversneden en voorverpakte groenten, fruit en granen van het vierde gamma.

Het Wetenschappelijk Comité is, op basis van de huidige kennis, van oordeel dat het huidige controleprogramma van het FAVV voldoende rekening houdt met deze diverse types van risicoproducten voor besmetting met humaan pathogene VTEC.

## **2.4. In welke mate kan het controleprogramma van het FAVV humaan pathogene VTEC detecteren en kan het autocontrolesysteem VTEC-uitbraken voorkomen?**

In België zijn de volgende VTEC-serogroepen opgenomen in het controleprogramma van het FAVV: VTEC O157, O26, O103, O111 en O145. EFSA schuift de volgende prioritaire VTEC-serogroepen naar voor: O157, O26, O91, O103, O111 en O145 (EFSA, 2007). In de Verenigde Staten wordt recent de focus gelegd op VTEC O157 en 'The Big Six' (= VTEC O26, O45, O103, O111, O121 en O145) (CDC, 2011). Het al dan niet opnemen van een bepaalde serogroep in het controleprogramma van een bepaald land is gesteund op de informatie die voorhanden is met betrekking tot de regionale prevalentie van die serogroep in de voedselketen en de associatie van die desbetreffende serogroep met voedselgebonden (ernstige) infecties, uitbraken en HUS. Vooral de serotypes die behoren tot de seropathotypes A en B (zie tabel 1) worden met prioriteit in de controleprogramma's van de voedselketen opgenomen. Recent wordt ten gevolge van de *E. coli* O104:H4-uitbraak in Duitsland in de Europese Unie ook aandacht besteed aan *E. coli* O104. *E. coli* O104:H4 behoort niet tot het seropathotype A of B en de stam bevat een combinatie van virulentiefactoren die voorheen nog niet beschreven was als oorzaak van een voedseluitbraak. Vóór de uitbraak zat deze stam niet in het vizier van controleprogramma's in de voedselketen en ook in klinische laboratoria was deze stam een relatief onbekend serotype als oorzaak van HC en/of HUS.

Het Wetenschappelijk Comité heeft geen directe wetenschappelijke basis om het controleprogramma van het FAVV in 2012 verder uit te breiden naar het opsporen van andere VTEC-serogroepen ten opzichte van de serogroepen onderzocht in 2011, aangezien er geen aanwijzingen zijn vanuit eventuele voedseluitbraken of vanuit de verzamelde klinische data van individuele HUS-infecties binnen België. Bovendien is er op dit ogenblik geen epidemiologische informatie voorhanden om uit de brede keuze van meer dan 400 serotypes van VTEC te beslissen welke serotypes een hoog risico vormen voor de volksgezondheid. Het is evident dat het screenen op meerdere VTEC-seropathotypes interessant kan zijn met het oog op het bekomen van meer informatie omtrent het voorkomen van diverse seropathotypes in de voedselketen. Er wordt wel aanbevolen om het aantal VTEC-seropathotypes in de monitoring van het FAVV verder uit te breiden op het moment dat verder onderzoek of notificaties vanuit de meldingsplicht uitwijzen dat bepaalde serotypes nieuwe of toenemende aandacht verdienen in de voedselketen. Tevens dient de monitoring met nieuwe VTEC-seropathotypes te worden uitgebreid wanneer indicaties vanuit klinische laboratoria signaleren dat bepaalde serotypes met bepaalde karakteristieken een significant probleem stellen voor de volksgezondheid.

De belangrijkste route van contaminatie van levensmiddelen met VTEC is fecale contaminatie door mens en dier (vooral via feces van herkauwers). Dit wijst ook op het belang om *E. coli* als hygiëne-indicator van fecale besmetting te blijven opnemen in het controleprogramma, dit naast de analyse op VTEC. Op termijn kunnen deze analyses eventueel ook gebruikt worden om de relatie tussen de aanwezigheid (en aantallen) van *E. coli* als hygiëne-indicatoren en enterische pathogenen verder te onderbouwen.

Tot op heden werd in de voedseldiagnostiek in de Europese Unie de focus gelegd op het screenen naar de aanwezigheid van *stx*-genen en het *eae*-gen (cfr. CEN/TC 275/WG 6). De combinatie van de aanwezigheid van deze virulentiefactoren en de prioritaire serogroepen aanbevolen door EFSA (EFSA, 2007), geeft aanleiding tot alertheid, notificatie en eventueel het nemen van correctieve acties in de voedselketen. De uitbraakstam *E. coli* O104:H4 bezit het *eae*-gen niet, echter wel het *aafA*-gen dat instaat voor adhesie aan het darmepitheel en het *aagR*-regulatorgen dat instaat voor aggregatieve adhesie. Het is daarom te overwegen om in de monitoring van het FAVV naast de screening op de aanwezigheid van *stx*-genen en het *eae*-gen en op de prioritaire VTEC-serogroepen ook aandacht te hebben voor de aanwezigheid van de combinatie van andere relevante virulentiefactoren en dit op suggestie van het Nationaal Referentielaboratorium (NRL) voor VTEC, het Europees Referentielaboratorium (EU-RL) voor VTEC of andere deskundige onderzoeksgroepen.

## **2.5. Welke bijkomstige beheers- en controlemaatregelen kunnen door het FAVV genomen worden om VTEC-uitbraken te voorkomen?**

Het uitvoeren van microbiologische analyses op eindproducten is geen garantie voor de veiligheid van de voedselketen met betrekking tot VTEC. Er zijn namelijk belangrijke beperkingen die inherent zijn aan het bemonsteringsplan. Vooral bij het opvolgen van pathogene kiemen met een zeer lage prevalentie in de voedselketen (< 1 %) zouden zeer hoge aantallen monsters nodig zijn om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de contaminatiegraad van de levensmiddelen in kwestie. Bijvoorbeeld, om de prevalentie van *E. coli* O157 op vleesproducten te schatten met een betrouwbaarheid van 95 % en een nauwkeurigheid van 0,05 %, waarbij de verwachte prevalentie 0,5 % bedraagt, zijn 76.446 monsters nodig. Bovendien zijn de bestaande detectietechnieken niet gevoelig en specifiek genoeg om alle risicovolle serogroepen aan te tonen in het brede toepassingsgebied van levensmiddelen die op de markt gebracht worden.

De beheersing van de problematiek van pathogene kiemen in de voedselketen dient bijgevolg preventief aangepakt te worden via het uitgewerkte autocontrolesysteem van de betrokken sectoren en dient door het FAVV of de certificatie-instellingen gecontroleerd te worden. Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan dat het FAVV toeziet op het gebruik van goede hygiënische werkpraktijken zowel tijdens de dierlijke productie, het slachtproces en de verwerking van vlees en melk (omwille van de historische associatie van VTEC met dierlijke producten), als tijdens de teelt, de oogst, de verwerking en de handel van verse rauwe plantaardige voedingsmiddelen (met inbegrip van kiemgroenten) die zonder een doeltreffende microbiële inactivatiestap geconsumeerd worden (gezien de toenemende associatie van VTEC met plantaardige producten). De persoonlijke hygiëne en vooral de handhygiëne van het personeel dat actief is in alle stadia van de voedselketen dient benadrukt te worden. Wettelijk wordt gesteld dat personen die rechtstreeks in contact komen met levensmiddelen, door middel van een medisch attest dienen te bewijzen dat geen enkele medische reden hun activiteit in de levensmiddelensector in de weg staat. Hierbij wordt verwezen naar het koninklijk besluit van 3 februari 2012 tot wijziging van het koninklijk besluit van 22 december 2005 betreffende levensmiddelenhygiëne met betrekking tot het medisch attest. Personen die in de voedingssector werkzaam zijn, mogen bijgevolg niet lijden aan of drager zijn van een via levensmiddelen overdraagbare aandoening. In sommige gevallen vertonen besmette personen geen symptomen waardoor een aandoening ongemerkt kan verspreid worden. Daarom is het Wetenschappelijk Comité van mening dat de nadruk moet gelegd worden op het begrip 'standaardvoorzorgsmaatregelen': iedere bewerker moet hygiënische maatregelen volgen, met de nadruk op handhygiëne/toilethygiëne.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan om de sectorgids voor de primaire productie en de sectorgids voor de aardappelen-, groenten- en fruitverwerkende industrie uit te breiden met specifieke aanbevelingen voor risicovolle producten zoals bladgroenten, verse tuinkruiden en kiemgroenten. Tevens wordt er aanbevolen om op het niveau van de primaire plantaardige productie en verwerking voldoende begeleiding en informatie te voorzien met betrekking tot de microbiologische gevaren en de mogelijke transmissieroutes naar de mens. Een voorbeeld waar deze kennis op een eenvoudige en duidelijke manier wordt aangebracht, is het document "Five keys to growing safer fruits and vegetables" (WHO, 2011) (zie bijlage 2). Ten slotte is het Wetenschappelijk Comité van mening dat het gebruik van water met een voldoende microbiologische kwaliteit een bijzonder punt van aandacht moet zijn. De overdracht van VTEC vanuit het irrigatiewater naar groenten werd reeds vastgesteld (Söderström *et al.*, 2008). De transfer van *E. coli* O157 via irrigatie- of waswater van onvoldoende microbiologische kwaliteit (en verhoogde aantallen van *E. coli* (O157)) is eveneens mogelijk en werd vastgesteld bij experimenteel onderzoek (Luo *et al.*, 2011; Van der Linden *et al.*, 2011). De transfer van *E. coli* via waswater kan voorkomen worden door het toevoegen van desinfectantia (als technisch hulpmiddel) aan het waswater. Desinfectie van waswater is evenwel geen optie om *E. coli* efficiënt te verwijderen van besmette groenten. Uit experimenteel onderzoek blijkt immers dat een reductie van slechts 0,5 tot 1,0 log in microbiële besmetting kan bekomen worden (Baert *et al.*, 2009; Keskinen & Annous, 2011; López-Gálvez *et al.*, 2009).

## **2.6. Welke aanpak kan gehanteerd worden om te voorkomen dat (onverwachte) VTEC-uitbraken escaleren tot een crisis?**

Voor het tijdig identificeren van een VTEC-uitbraak is er in de medische sector nood aan goede communicatie tussen klinische laboratoria onderling en aan een snelle en efficiënte centrale rapportering van gevallen van HUS bij de mens, ook voor wat betreft de karakteristieken van de isolaten (virulentie, serogroep, ...). Alle gevallen van bloederige diarree en HUS moeten onderzocht worden aan de hand van microbiologische diagnose en bijgevolg moeten alle middelen die dit mogelijk maken ter beschikking gesteld worden aan de medische sector. Hierdoor zullen uitbraken, zelfs indien ze over verschillende regio's verspreid zijn, sneller kunnen geïdentificeerd worden.

Er is nood aan een goede interactie en coördinatie en een adequate uitwisseling van informatie tussen de diverse nationale en Europese referentielaboratoria voor de analyse van VTEC in stalen afkomstig van mensen, dieren en voedsel waardoor informatie wordt verzameld omtrent de verspreiding van VTEC-stammen zowel bij de mens als in de voedselketen. Tevens is een goede doorstroming van deze informatie en kennis nodig naar de bevoegde autoriteiten (FAVV en Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu) en de agro-voedingssector, die verantwoordelijk zijn voor de veiligheid van de voedselketen. Zodoende dient er voldoende geïnvesteerd te worden in een adequaat epidemiologisch onderzoek om de link tussen klinische rapportering en gevalsstudies, en mogelijks verdachte levensmiddelen van een voedselinfectie, te leggen. Hiertoe is er nood aan geactualiseerde fiches over de pathogenen waarin informatie is opgenomen over de kenmerken van de pathogeen, mogelijke reservoirs, transmissieroutes, relevante geassocieerde levensmiddelen en recent gerapporteerde voedseluitbraken (eventueel gelinkt met atypische routes of levensmiddelen).

Bij een uitbraak dienen de monsternamenplannen en de nodige analyses adequaat te worden gecoördineerd. Het Wetenschappelijk Comité ondersteunt ten sterkste het continu actualiseren en verifiëren van een afdoende crisis- en communicatieplan zodat alle betrokken partijen (overheid, laboratoria, kenniscentra en betrokken sectoren) snel en gepast en in overleg kunnen reageren en communiceren voor het vroegtijdig detecteren van voedselinfecties door humaan pathogene VTEC. Bij het goed functioneren van een crisis- en communicatieplan is het belangrijk dat er een goede interactie is tussen o.a.:

- referentielaboratoria en internationale referentielaboratoria of expertlaboratoria aan onderzoeksinstituten of universiteiten (dier-voeding-mens);
- bedrijfslaboratoria en de overheid (uitwisseling van informatie).

Het NRL voor VTEC, het EU-RL voor VTEC of andere deskundige onderzoeksgroepen dienen moleculaire technieken te ontwikkelen waarmee op een snelle en efficiënte manier culturen en isolaten gescreend kunnen worden op de aanwezigheid van een brede waaier aan virulentiefactoren (zie 2.4.). Deze moleculaire technieken dienen een zo breed mogelijk gamma van de gekende virulentiegenen te omvatten en beschikbaar te zijn in het referentielaboratorium. Naast het opsporen van gekende virulentiegenen dienen ook de geschikte moleculaire subtyperingstechnieken (vb. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) of IS typering) ontwikkeld te worden. Op die manier kunnen individuele gevallen al dan niet gelinkt worden aan een uitbraak en kan de contaminatiebron of de meest waarschijnlijke (voedings)sector zo snel mogelijk geïdentificeerd worden. Informatie uit subtypering zou moeten geïntegreerd worden in surveillancegegevens. Er dient tevens de nodige aandacht besteed te worden aan de ontwikkeling van betere detectiemethoden, vooral in microbiologisch hoog beladen producten, zoals een aangepaste ophopingsstap voorafgaand aan de screening met bijvoorbeeld PCR (zie 2.2.). Wanneer de pathogene kiem (die vaak een lage infectieuze dosis heeft) tot voldoende aantallen kan uitgroeien en virulentiegenen via de moleculaire technieken kunnen gedetecteerd worden, zal de isolatie van reinkulturen gemakkelijker verlopen. Op die manier kan bij een uitbraak de contaminatiebron zo snel mogelijk opgespoord worden wat het aantal slachtoffers van dergelijke uitbraken kan beperken. Bovendien kunnen dan verdachte producten snel getest worden en met een grote betrouwbaarheid aangeduid worden als een verdacht of veilig agens.

### 3. Aanbevelingen

Het Wetenschappelijk Comité maakt de volgende aanbevelingen:

Aan de onderzoekswereld:

- onderzoek verder zetten ter identificatie van virulentiefactoren en serotypes van humaan pathogene *E. coli*-bacteriën die HUS veroorzaken;
- onderzoek voeren naar het volledige spectrum van mogelijke en noodzakelijke virulentiefactoren (of hun varianten) en hun regulatormechanismen van humaan pathogene VTEC;
- onderzoek uitvoeren omtrent de verspreiding van het mogelijks brede spectrum aan virulentiekarakteristieken bij pathogene VTEC, zowel humaan als in de voedselketen (inclusief dier en plant);
- verder onderzoek uitvoeren naar de reservoirs en de transmissieroutes van gekende VTEC-seropathotypes;
- kennis verwerven omtrent de mogelijke aanwezigheid van EAEC en/of hun typische adhesiegenen bij humane *E. coli*-stammen (zowel bij *E. coli*-isolaten van patiënten met klinische symptomen als bij gezonde personen), bij *E. coli*-stammen uit dierlijke reservoirs en de voedselketen (plantaardige en dierlijke producten);
- bijkomend onderzoek opstarten naar nieuwe pathotypes die berusten op een alternatieve combinatie van virulentiefactoren (vb. EAEC-VTEC) en waarvan de verspreiding en de mogelijkheid tot overleving in de voedselketen onbekend zijn;
- kennis verwerven over de epidemiologische verwantschap van VTEC, de evolutionaire relatie tussen VTEC en de homologie van hun virulentiefactoren ten opzichte van andere pathogene *E. coli*-groepen;
- onderzoek verder zetten om de evolutie van VTEC-stammen op te volgen, te begrijpen en te voorspellen, en meer specifiek van de niet-O157:H7-serotypes;
- onderzoek voeren naar de mogelijkheid tot groei en overleving van diverse humaan pathogene *E. coli*-stammen in de voedselketen met het oog op het verwerven van kennis omtrent de mogelijke persistentie van dergelijke kiemen in de voedselketen;
- onderzoek opstarten naar recent geïdentificeerde VTEC-serotypes die in andere regio's worden beschreven, waarvan enkel sporadische gevallen genoteerd zijn of waar nieuwe technologie voor bekend wordt;
- onderzoek uitvoeren naar het effect en de efficiëntie van klassieke interventiestrategieën (vb. wasprocedures, reiniging en desinfectie, decontaminatie (inclusief van zaden) of conserveringstechnieken (aanzuring, verpakking, verhitting, enz.)) en naar de efficiëntie van nieuwe preventieve hygiënemaatregelen in de sector van de kiemgroenten;
- ontwikkelen van moleculaire technieken ter identificatie van virulentiefactoren van VTEC, met inbegrip van subtyperings- en snelle fingerprinting methoden, en met integratie van de bekomen informatie in surveillancegegevens;
- optimalisering van de methoden voor kweek en isolatie van humaan pathogene VTEC-serotypes, vooral in het toepassingsgebied van monsters met een hoge microbiologische belasting met gelijkaardige nevenflora.

Aan het FAVV:

- het evalueren van het risico van de productieprocessen van kant-en-klare verse rauwe plantaardige voedingsmiddelen;
- het jaarlijks evalueren van het controleprogramma met betrekking tot humaan pathogene VTEC in functie van de kennis over circulerende humaan pathogene seropathotypes;
- controles uitvoeren op de beheersing van fecale besmetting via analyse van *E. coli*, in parallel met controles op VTEC in de voedselketen aangezien deze laatste alleen geen garantie kunnen bieden;
- naast de screening op de aanwezigheid van *stx*-genen en het *eae*-gen en op de prioritaire VTEC-serogroepen ook aandacht hebben voor de aanwezigheid van de combinatie van relevante virulentiefactoren en dit op suggestie van het NRL voor VTEC, het EU-RL voor VTEC of andere deskundige onderzoeksgroepen;
- controles uitvoeren op het respecteren van de algemene hygiëne;

- de sectorgids voor de primaire productie en de sectorgids voor de aardappelen-, groenten- en fruitverwerkende industrie te laten uitbreiden met specifieke aanbevelingen over risicovolle producten zoals bladgroenten, verse tuinkruiden en kiemgroenten;
- informatie verstrekken naar sectoren, bedrijven en consumenten omtrent preventief te nemen maatregelen en goede werkpraktijken (vb. brochures voor consumenten met melding van het belang van goede handhygiëne, informatie over groenten wassen, enz.);
- onderzoek voeren naar de noodzaak voor het opstellen van specifieke crisis- en communicatieplannen die van toepassing zijn in geval van een uitbraak van VTEC.

Aan de medische sector en diverse diagnostische laboratoria:

- zorgen voor een efficiënte en snelle centrale rapportering van gevallen van HUS;
- onderzoeken van alle gevallen van bloederige diarree en HUS bij de mens;
- zorgen voor een goede communicatie en informatie-uitwisseling tussen humaan klinische, diergeneeskundige en voedingslaboratoria.

Voor het Wetenschappelijk Comité,  
De Voorzitter,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Brussel, 04/05/2012

## Referenties

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FAVV, 2011. *E. coli* O104 in levensmiddelen versie 2, methode voor de detectie en isolatie van EHEC O104, 09/06/2011. Beschikbaar op het adres: <http://www.favv-afsca.be/laboratoria/erkendelaboratoria/dienstnotas/default.asp>.

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

ILSI Europe, 2011. The Enterobacteriaceae and their Significance to the Food Industry. ILSI Europe Report Series. Beschikbaar op het adres: <http://www.ilsio.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf>.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WHO, 2011. Five keys to growing safer fruits and vegetables: promoting health by decreasing microbial contamination. Trial edition for field testing, June 2011. Beschikbaar op het adres: [http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys\\_growing\\_trial\\_edition.pdf](http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys_growing_trial_edition.pdf).

## Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden:

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

\*: uitgenodigde experts

## Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor risicobeoordeling en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerp advies. De werkgroep was samengesteld uit:

Leden Wetenschappelijk Comité	M. Uyttendaele (verslaggever), L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, H. Imberechts
Externe experts	G. Daube (ULg), J. Mainil (ULg), D. Piérard (VUB), I. Sampers (Howest)

Het Wetenschappelijk Comité dankt P. Fach (ANSES) en M. Heyndrickx (ILVO) voor de *peer review* van het advies.

## Wettelijk kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 9 juni 2011.

## Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.

## **Bijlagen**

Bijlage 1: Flow diagram voor de detectie van VTEC

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