

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 27 novembre 2014

## **AVIS**

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

**relatif à « une demande d'appui technique et scientifique relatif à des épisodes de toxi-infections alimentaires collectives liés à la consommation de betteraves crues râpées »**

---

*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.*

---

L'Anses a été saisie le 05 août 2014 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'appui technique et scientifique relatif à des épisodes de toxi-infections alimentaires collectives liés à la consommation de betteraves crues râpées (2014-SA-0174).

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

### **1.1. Éléments de contexte**

Depuis le mois de janvier 2014, l'Unité d'alerte (UA) de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) a été informée de quatre épisodes de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) impliquant la consommation de betteraves crues râpées survenus en milieu scolaire, affectant près de 450 enfants. L'historique est résumé ci-dessous :

- **Janvier 2014** : Il est signalé à l'UA deux épisodes de TIAC à trois jours d'intervalle, impliquant pour chacun d'eux plus de 100 enfants malades dans une dizaine d'écoles, en Alsace et dans le Nord-Pas-de-Calais (> 250 enfants malades dans 20 écoles au total).

Les symptômes étaient les suivants : vomissements et douleurs abdominales dans les 15-30 minutes suivant le début du repas. Les enquêtes épidémiologiques réalisées séparément dans les deux départements ont montré une association significative avec la consommation de

betteraves crues râpées, et aucune association avec les autres aliments servis. Les écoles étaient approvisionnées par deux cuisines centrales différentes. Le seul aliment commun à ces deux cuisines centrales était des betteraves crues râpées. L'enquête de traçabilité des betteraves réalisée par la DGCCRF, a montré que les betteraves servies dans ces deux départements provenaient d'un même producteur belge et étaient de variété « boro ».

Rétrospectivement, cet épisode a été rapproché par l'Institut de veille sanitaire (InVS) à une TIAC similaire survenue en 2010 dans le Morbihan, qui avait impliqué plus de 500 enfants, et pour laquelle la consommation de betteraves crues râpées avait également été retenue comme responsable. A l'époque, seules des recherches de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Clostridium perfringens* avaient été réalisées sur les betteraves incriminées et étaient revenues négatives.

L'analyse de la littérature réalisée par l'InVS a permis de trouver une publication finlandaise de 2010 qui rapporte sept épisodes similaires en lien avec la consommation de betteraves crues râpées (Jacks, Toikkanen *et al.* 2013). Dans quatre des sept épisodes finlandais, *Pseudomonas fluorescens* a été isolé des betteraves incriminées, sans que la responsabilité de ce germe n'ait pu être retenue.

Pour les TIAC d'Alsace et du Nord-Pas-de-Calais, les recherches suivantes ont été faites sur les betteraves incriminées :

- *S. aureus* et entérotoxines staphylococciques : négative
- *B. cereus* et toxine émétique de *B. cereus* : négative
- Mycotoxine DON (déoxynivalénol) : négative
- *Aspergillus spp.* : négative
- *Pseudomonas spp.* : négative
- Résidus de pesticides (analyse multirésidus): négative

- Avril 2014 : Un nouvel épisode similaire dans deux centres de loisirs du 19<sup>ème</sup> arrondissement de Paris approvisionnés par une même cuisine centrale est porté à la connaissance de l'UA.

Vingt-deux enfants et trois adultes malades ont fait état de vomissements et douleurs abdominales dans les 15 minutes suivant le début du repas, la plupart des malades n'ayant alors consommé que l'entrée lors de la survenue des symptômes. De nouveau, des betteraves crues râpées ont été incriminées. Cependant, moins d'informations étaient disponibles sur cet épisode qui n'a pas bénéficié d'une investigation épidémiologique approfondie. Des échantillons de betteraves incriminées ont été conservés à l'Anses (Unité LCSV – Maisons-Alfort).

- Fin mai 2014 : L'UA est informée d'une nouvelle TIAC, en région Midi-Pyrénées, impliquant 12 écoles approvisionnées par une même cuisine centrale, lors du même déjeuner.

Environ 150 enfants ont été malades et ont présenté des symptômes similaires : vomissements et douleurs abdominales dans les 15-30 minutes suivant le début du repas. De nouveau, l'investigation épidémiologique a démontré une association significative avec la consommation de betteraves crues râpées, et aucune association avec les autres aliments consommés. L'enquête de traçabilité a montré que les betteraves avaient été conditionnées en France et provenaient d'Espagne. La variété suspectée était « Monty RZ » mais l'enquête menée auprès du conditionneur français suggérait qu'il s'agissait plutôt d'un mélange de plusieurs variétés de betteraves.

Pour cette nouvelle TIAC les recherches suivantes sur un lot déconditionné de betteraves incriminées ont été faites au Service commun des laboratoires (SCL) de Montpellier ainsi qu'aux laboratoires SCL d'Île-de-France et de Rennes:

- *S. aureus* : négative (pas de recherche d'entérotoxines staphylococciques faite)
- *B. cereus* : négative (pas de recherche de toxines de *B. cereus* faite)
- *Pseudomonas* : dénombrement important ( $> 2.10^6$  UFC/g) de *Pseudomonas* sur milieu spécifique. Plusieurs types de colonies. Identification sur galeries API® de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*.

Des prélèvements de betteraves entières et de betteraves râpées en provenance du même fournisseur espagnol que celles mises en cause dans l'épisode de TIAC de Midi-Pyrénées ont été réalisés auprès du conditionneur français. L'analyse réalisée par le SCL 34 sur ces prélèvements a mis en évidence la présence de *Pseudomonas spp.* avec un dénombrement de l'ordre de  $4.10^4$  à  $2,5.10^6$  ufc/g dans les betteraves crues entières et de l'ordre de  $3,2.10^7$  ufc/g dans les betteraves râpées (mêmes betteraves que les betteraves crues). Les *Pseudomonas spp.* dénombrées appartiennent aux espèces *fluorescens*, *putida* et/ou *aeruginosa*.

- Août 2014 : l'UA est informée d'un épisode de TIAC, survenu en région Provence-Alpes Côte d'Azur au sein d'une maison de retraite. Onze adultes parmi environ 130 pensionnaires de cette maison de retraite ont présenté des vomissements et des douleurs abdominales dans les 15 minutes suivant le début du repas, après consommation de betteraves crues râpées, aucun autre aliment n'ayant été consommé. L'enquête de traçabilité a montré que les betteraves avaient été conditionnées en France et provenaient du même producteur espagnol que celui impliqué dans la TIAC survenue au mois de mai en région Midi-Pyrénées.

Pour cette nouvelle TIAC les recherches suivantes ont été faites au Laboratoire vétérinaire départemental des Alpes-Maritimes, sur un lot déconditionné de betteraves incriminées :

- *S. aureus* : négative (pas de recherche d'entérotoxines staphylococciques faite)
- *B. cereus* : négative (pas de recherche de toxines de *B. cereus* faite)
- *Pseudomonas* : négative
- Mycotoxines (toxines T-2 et HT-2, zéaralénone, DON) : négative
- Résidus de pesticides (analyse multirésidus): négative

## **1.2. Questions pour lesquelles l'avis de l'Anses est attendu**

Au regard de ces éléments de contexte, afin de permettre à la DGCCRF d'identifier l'agent qui pourrait être impliqué dans les épisodes de TIAC liés à la consommation de betteraves crues râpées, il est demandé de réaliser une analyse bibliographique large portant sur les épisodes de TIAC ou plus largement les symptômes digestifs rapportés comme en relation avec des betteraves crues ou cuites (notamment celles incriminées, comme Boro et Monty RZ) ou de produits de familles végétales apparentées, en reportant les causes suspectées ou identifiées.

Par ailleurs, au regard des données figurant dans la note d'appui scientifique et technique en date du 4 juillet (Anses AST n°2014-SA-0115 2014) relatif aux tomates cerises en provenance du Maroc et des hypothèses énoncées, la DGCCRF sollicite plus particulièrement l'avis de l'Anses sur les points suivants :

- Si des toxines ont été produites par des microorganismes qui ne seraient plus présents ou détectables (par exemple toxines de *Pseudomonas spp*) ou sont intrinsèques aux betteraves (en lien avec les variétés, leur maturation, des champignons endophytes ou leur milieu de culture) : quelle méthode de screening pourrait être utilisée pour les mettre en évidence ?
- Si un agent chimique présent dans les betteraves, la terre (si le lavage était insuffisant) ou encore dans le milieu de conservation (liquide frigorigène) est responsable des symptômes qui caractérisent ces TIAC : quelle(s) analyse(s) devrai(en)t être pratiquée(s) pour le caractériser et selon quel protocole ?

## **2. QUESTIONS INSTRUITES PAR L'ANSES**

Dans un contexte de TIAC liés aux betteraves crues râpées, l'Anses est sollicitée pour apporter, dans les plus brefs délais, des éléments de réponse dans le cadre d'un appui scientifique et technique. Les questions de la saisine ont été reformulées pour tenir compte du court délai accordé à l'expertise. Les questions instruites par l'Anses sont les suivantes :

- Réaliser une analyse bibliographique large portant sur les épisodes de TIAC ou plus largement les symptômes digestifs rapportés comme en relation avec des betteraves crues ou cuites (notamment celles incriminées, comme Boro et Monty RZ) ou de produits de familles végétales apparentées, en reportant les causes suspectées ou identifiées.
- La présence de *Pseudomonas spp.* avec un dénombrement important a été mise en évidence dans quelques échantillons incriminés. Les souches de *Pseudomonas spp.* isolées en vue de leur caractérisation, ainsi que les échantillons incriminés ou témoins, ont été transmis à l'INRA d'Avignon. Dans l'attente de ces résultats, quelles informations sont d'ores et déjà disponibles sur l'origine et la présence de *Pseudomonas spp.* dans les végétaux crus et quelle est leur pathogénicité ?
- Si des toxines ont été produites par des microorganismes qui ne seraient plus présents ou détectables (*Pseudomonas spp* et autres), quelle(s) méthode(s) de screening pourrai(en)t être utilisée(s) pour les mettre en évidence ?
- Si des toxines intrinsèques à certaines variétés de betteraves, et plus particulièrement les variétés de betteraves « Boro » et « Monty RZ », sont produites (en lien avec les variétés, leur maturation, la présence de champignons endophytes ou leur milieu de culture), ces dites betteraves sont-elles consommables crues ? Ces dites toxines sont-elles thermolabiles ? Quelle(s) méthode(s) de screening pourrai(en)t être utilisée(s) pour les mettre en évidence ?
- Si un agent chimique présent dans la terre (si le lavage était insuffisant) ou encore dans le milieu de conservation (liquide frigorigène) est responsable des symptômes qui caractérisent ces TIAC, quelle(s) analyse(s) devrai(en)t être pratiquée(s) pour le caractériser et selon quel protocole ?

### 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 entre le 16 septembre 2014 et le 04 novembre 2014, par le comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments (BIORISK) », sur la base d'un rapport interne de l'unité d'évaluation des risques chimiques liés aux aliments et d'un rapport de synthèse réalisée par un groupe de trois experts-rapporteurs, l'un issu du CES BIORISK, les deux autres de l'école VetAgro Sup et de l'INRA d'Avignon.

Par ailleurs, certains experts ayant participé aux investigations lors des épisodes de TIAC de 2010 en Finlande, ont été auditionnés lors d'une conférence téléphonique tenue le 16 octobre 2014. Le rapport d'audition (en anglais) est annexé au présent avis.

### 4. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

#### 4.1. Analyse bibliographique

##### 4.1.1. Démarche

L'analyse bibliographique a porté sur la recherche de tous travaux publiés associant des fruits et légumes à des intoxications et à des maladies amenant à des symptômes de type vomissements, nausées ou diarrhées. La recherche a été conduite avec le Web of Science à partir de l'année 1974, et à partir des bases de données Pubmed et Scopus. A partir des titres obtenus, ceux mentionnant des maladies de la plante et non du consommateur, homme ou animal, et ceux mentionnant l'empoisonnement d'animaux par des végétaux non consommés par l'homme, ont été écartés. En parallèle, afin de répertorier des cas d'intoxications alimentaires similaires, plusieurs bases de données recensant des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ayant eu lieu aux Etats-Unis ont été interrogées<sup>1</sup>. La liste obtenue a fait l'objet d'une analyse approfondie.

Enfin, les correspondants européens de l'Agence ont été sollicités afin de signaler la survenue de TIAC similaires associées à des betteraves. Seule l'Allemagne a fait part de la récente publication d'une TIAC survenue dans une maison de retraite en 2013, causée par des entérotoxines staphylococciques, et pour laquelle une salade de betteraves cuites avait été incriminée<sup>2</sup>.

##### 4.1.2. Articles scientifiques sur la thématique

###### ▪ Articles concernant la betterave et les légumes taxonomiquement proches

Seuls deux articles concernent la betterave. D'une part la publication décrivant les intoxications liées à la consommation de betteraves crues râpées en Finlande (Jacks, Toikkanen *et al.* 2013), très similaires aux TIAC faisant l'objet de la présente saisine, et d'autre part un article de 1975 concernant l'intoxication de bétail par de la pulpe de betteraves sucrières (Nielsen, Krogh *et al.* 1975).

<sup>1</sup> <http://www.outbreakdatabase.com/>;  
<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx> <https://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak/pathogen.php#>

<sup>2</sup> <http://www.bfr.bund.de/cm/343/an-krankheitsausbruechen-beteiligte-lebensmittel-in-deutschland-im-jahr-2013.pdf>

- Jacks, Toikkanen *et al.* (2013) décrivent sept TIAC survenues en Finlande, en 2010, pour lesquelles 124 cas présentaient des symptômes de nausées, douleurs abdominales, vomissement et diarrhées, survenant entre cinq minutes et 21 heures après le repas. Les cas étaient fortement associés à la consommation de betteraves crues râpées. L'analyse des échantillons (selles et vomissements) de certains patients n'a pas permis de retrouver les bactéries pathogènes recherchées (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *C. perfringens*, *B. cereus*, *S. aureus*), ni les entérotoxines de *S. aureus*. Des norovirus n'ont été détectés que dans un seul des échantillons fécaux. Les auteurs soulignent la mauvaise qualité des betteraves, conservées au froid sous forme pelées et emballées jusqu'à 25 jours avant consommation. En revanche, une population de  $10^6$  à  $10^7$  *P. fluorescens* par gramme a été dénombrée dans certains des échantillons de betteraves râpées associées à ces cas de TIAC. Les auteurs précisent qu'à la suite de soupçons sur le rôle de *Pseudomonas*  $\beta$ -hémolytiques dans des gastroentérites sporadiques en Finlande en 2002, ils ont cultivé directement les échantillons de betteraves sur gélose au sang et isolé les colonies pour les identifier comme étant *P. fluorescens* par le test d'oxydase, la confirmation de l'hémolyse, les galeries API 20 NE® et des températures de croissance. Les populations rapportées concerneraient donc des *P. fluorescens*  $\beta$ -hémolytiques.
- le texte intégral de la publication de Nielsen *et al.* (1975) n'a pu être obtenu. Selon le résumé, la pulpe de betteraves présentait des attaques de moisissures, suggérant une intoxication par des mycotoxines mais qui n'a pas été confirmée (Nielsen, Krogh *et al.* 1975).

Concernant les légumes taxonomiquement proches de la betterave (épinards, blettes et salicornes de la famille des *Amaranthaceae*) :

- tous les articles retrouvés, à l'exception d'un seul, concernaient l'épidémie causée par la consommation d'épinards infectés par *Escherichia coli* O157:H7 (Wendel, Johnson *et al.* 2009), dont les symptômes étaient très différents de ceux des TIAC faisant l'objet de la présente saisine ;
- un article mentionne l'intoxication, à l'oxalate, d'un troupeau de cerfs soumis à un régime exclusivement composé d'épinards, les animaux intoxiqués montrant des symptômes d'hypocalcémie (Pourjafar, Badiei *et al.* 2009).

#### ▪ Articles concernant d'autres fruits et légumes

La majorité des articles relatent des épisodes causés par des bactéries ou virus bien connus comme agents de maladies infectieuses transmises par les aliments. Citons à titre d'exemple : *E. coli* O157 entérohémorragique (Ackers, Mahon *et al.* 1998), *E. coli* entérotoxigénique (Ethelberg, Lisby *et al.* 2010), hépatite A (Anonymous 2004), norovirus (Bernard, Faber *et al.* 2014), *Cryptosporidium* (Millard, Gensheimer *et al.* 1994), *Cyclospora* (Anonymous 2014), *Angiostrongylus cantonensis* (Tsai, Lee *et al.* 2004), *Salmonella* (Behraves, Blaney *et al.* 2012), *Shigella* (Dunn, Hall *et al.* 1995), *Listeria monocytogenes* (Gaul, Farag *et al.* 2013), *Yersinia pseudotuberculosis* (Jalava, Hakkinen *et al.* 2006), *Yersinia enterocolitica* (MacDonald, Heier *et al.* 2012). Ces agents provoquent des infections dont la durée d'incubation n'est pas compatible avec la rapidité d'apparition des symptômes décrite lors des TIAC faisant l'objet de la présente saisine. Des maladies causées par *Clostridium botulinum* (Angulo, Getz *et al.* 1998; Sheth, Wiersma *et al.* 2008; StLouis, Peck *et al.* 1988) et *Bacillus cereus* (Moreno, Orr *et al.* 1985; Portnoy, Goepfert *et al.* 1976), deux agents d'intoxinations capables de produire des toxines dans les aliments, ont été décrits pour différents types de légumes. Les symptômes décrits lors des TIAC faisant l'objet de la saisine pourraient correspondre à ceux d'une intoxication par la toxine émétique de *Bacillus*

*cereus* (Stenfors Arnesen, Fagerlund *et al.* 2008). Néanmoins, ni la bactérie, ni ses toxines n'ont été retrouvées dans les échantillons de betteraves râpées analysés.

Un ensemble d'articles rapportent des intoxications dues à la contamination de légumes par des végétaux toxiques, comme le datura dans des légumes surgelés (Termala, Pohjalainen *et al.* 2014), ou l'aconite dans des salades ou soupes (Chan 2014; Weijters, Verbunt *et al.* 2008), ou encore des tiges de narcisses confondus avec des oignons verts (Matulkova, Gobin *et al.* 2012). En l'absence de description détaillée de la chaîne de transformation, il est difficile de répondre à la question de l'implication de la contamination du produit râpé par des composés toxiques du fait de la présence d'adventices dans les lots de betteraves. Néanmoins, cette hypothèse paraît peu probable dans la mesure où les racines passent probablement par des étapes de lavage et de parage, incluant sans doute un tri, avant d'être pelées et râpées.

Certains végétaux normalement comestibles ont provoqué des intoxications chez des sujets présentant des facteurs de risques particuliers et/ou en cas d'exposition particulièrement importante. Par exemple, le carambole (*Averrhoa carambola*) provoque des troubles neurologiques graves chez des personnes atteintes de troubles rénaux chroniques (Herbland, El Zein *et al.* 2009). La molécule responsable ne serait pas l'acide oxalique comme initialement supposé, mais une molécule proche de la phénylalanine nommée caramboxine par Garcia-Cairasco, Moyses-Neto *et al.* (2013). Le psoralène contenu dans le céleri est connu pour provoquer des « photodermatites » en cas de fortes expositions au végétal combiné à de fortes expositions au soleil (Finkelstein, Afek *et al.* 1994). Aucun facteur de risque particulier n'est mentionné pour les victimes des TIAC faisant l'objet de cette saisine.

D'autres intoxications ont été causées par des fruits ou légumes consommés à des stades de maturité non adéquats, ou par la consommation de certaines parties d'une plante par ailleurs comestible, ou par la consommation de parties comestibles d'une plante mais ayant accumulé des composés toxiques à la suite d'une exposition à des facteurs de stress particuliers ou à des modes de cultures particuliers. Par exemple le fruit du *Blighia sapida* (ackee) consommé en Afrique de l'Ouest et à la Jamaïque serait toxique avant maturité (Quere *et al.* 1999). Des cas d'intoxications causées par les fruits de *Solanum torvum*, utilisés notamment pour la fabrication de certains curry, ont été attribués à la présence inhabituelle de certains glycoalcaloïdes (Smith, Giesbrecht *et al.* 2008). Les fruits à l'origine de l'intoxication sont décrits comme non mûrs dans la publication de Smith *et al.* (2008), mais la cause de l'accumulation des glycoalcaloïdes toxiques n'est pas formellement établie. Dans les cas de « photodermatites » mentionnés dans le paragraphe précédent, le céleri contenait une teneur particulièrement élevée en psoralène, du fait d'un ensoleillement particulièrement important (Finkelstein, Afek *et al.* 1994). La combinaison de conditions de cultures des pommes de terre favorisant la production de solanine (exposition des tubercules à la lumière par exemple) et de préparations culinaires ne permettant pas son élimination (consommation de la peau des tubercules ou cuisson à sec), peut conduire à des intoxications (Anonymous 1979). De même, en cas d'infection par des champignons phytopathogènes, la racine de patates douces accumule le composé toxique ipoméamarone (Martin, Hasling *et al.* 1978). Toutefois les seuls cas d'intoxication avec ce légume retrouvés concernent du bétail et non des humains (Mawhinney, Woodger *et al.* 2008). Un dernier exemple concerne une intoxication causée par des aubergines contenant des alcaloïdes toxiques, suite à un greffage des plants sur du datura (Oshiro, Kuniyoshi *et al.* 2008). L'état de maturité, les conditions de stress subis par le végétal avant sa consommation, le mode de préparation, l'infection de la plante par des phytopathogènes, la variété, sont autant de facteurs qui peuvent

provoquer l'accumulation de composés toxiques dans des fruits et légumes couramment consommés.

#### 4.1.3. Autres exemples d'intoxications « inhabituelles »

Sur d'autres catégories d'aliments que les fruits et légumes, des exemples d'intoxications rares, sur des produits largement consommés peuvent être cités :

- La production d'acide bongkrekiac par *Pseudomonas cocovenenans*, maintenant reclassé dans les *Burkholderia* (Jiao, Kawamura *et al.* 2003), lors de la fabrication de certains plats de céréales ou de noix de coco fermentés consommés en Chine et en Indonésie (Zhao, Ma *et al.* 1990). Ces intoxications résultent d'une combinaison de facteurs, forte multiplication de la bactérie dans l'aliment (lorsqu'elle surpasse la microflore de fermentation) et composition de l'aliment induisant la production de l'acide bongkrekiac (Garcia, Hotchkiss *et al.* 1999), ce qui peut expliquer qu'elles ne surviennent que sur une gamme très restreinte d'aliments.
- Des intoxications caractérisées par des nausées, des vomissements, des diarrhées survenant rapidement (quelques minutes à quelques heures) après le repas et associées à de fortes populations de *Bacillus*, autres que *B. cereus*, comme *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* (From, Hormazabal *et al.* 2007; From, Pukall *et al.* 2005; Gilbert et Kramer 1984; Salkinoja-Salonen, Vuorio *et al.* 1999). Les aliments incriminés sont divers (riz, pizza, pain, plats cuisinés, aliments pour bébés). La purification des principaux toxiques sur des modèles cellulaires a conduit à l'identification de lipopeptides produits par ces souches de *Bacillus* spp (Apetroaie-Constantin, Mikkola *et al.* 2009; From, Hormazabal *et al.* 2007). Il est probable que seule la présence de certaines souches plus « toxigènes » parmi les espèces de *Bacillus* citées, associée à des conditions permettant une forte multiplication et une production des lipopeptides toxiques dans l'aliment, conduisent à des intoxications.
- Aux Etats-Unis, deux séries d'épidémies de gastroentérites survenues dans les écoles ont été attribuées à la consommation de tortillas, en 1997-1998 puis en 2003-2004 (Anonymous 2006). Les symptômes de vomissements et de diarrhées survenant rapidement après le repas suggéraient la présence d'un composé toxique dans l'aliment. Ni métaux lourds, ni mycotoxines, ni toxines bactériennes ou végétales n'ont été détectés. L'analyse des tortillas dans l'une des épidémies a fait ressortir des concentrations en additifs de fabrication (propionate de calcium et bromate de potassium) 10 à 50 fois supérieures à celles de tortillas témoins, mais néanmoins similaires à celles retrouvées normalement dans d'autres types d'aliments. Les auteurs restent donc prudents dans leurs conclusions quant au rôle de ces additifs dans les symptômes.

## 4.2. Informations relatives à la présence de *Pseudomonas*

### 4.2.1. A-t-on la certitude que les germes dénombrés dans les rapports d'alerte évoqués dans la présente saisine sont bien des *Pseudomonas* ?

Pour les épisodes de janvier et mai 2014, les données transmises indiquent un dénombrement sur milieu CFC (48h d'incubation à 25°C) et une identification des espèces *fluorescens*, *putida* et/ou *aeruginosa* par galerie Api 20 NE®.

Il est cependant difficile d'apprécier, avec la rigueur nécessaire, la présence des espèces citées, ni d'écarter des espèces taxonomiquement proches telles que celles appartenant aux genres *Burkholderia* ou *Stenotrophomonas* (espèces pathogènes).

En effet, comme pour la plupart des milieux sélectifs, on ne peut affirmer avec certitude que le milieu CFC permet de dénombrer tous les *Pseudomonas* et seulement les *Pseudomonas* (Doulgeraki et Nychas 2013; Tryfinopoulou, Drosinos *et al.* 2001).

Concernant l'identification des isolats, les documents font état de l'utilisation du système miniaturisé Api 20 NE® sans précision du nombre d'isolats identifiés, ni de leurs proportions respectives. L'identification évoquée des espèces *fluorescens*, *putida* et/ou *aeruginosa* ne peut être considérée avec certitude. En effet, le système Api 20 NE® (Biomérieux, Marcy l'étoile, France) repose sur la mise en évidence de 21 caractères phénotypiques et ne permet d'identifier que quelques 14 espèces parmi les 230 actuellement répertoriées. Nombreux sont d'ailleurs les auteurs qui ont mis en évidence le manque de fiabilité de cette méthode pour l'identification d'isolats environnementaux, cliniques ou alimentaires de *Pseudomonas* au rang d'espèces (Andreani, Martino *et al.* 2014; Arnaut-Rollier, De Zutter *et al.* 1999; Bosshard, Zbinden *et al.* 2006; Christensen et Poulsen 1994; Dogan et Boor 2003; Marchand, Vandriesche *et al.* 2009; Scotta, Mulet *et al.* 2012a).

Des remarques similaires concernent le cas des toxi-infections en Finlande, puisque dans l'article qui les relate, le dénombrement des *Pseudomonas* a été réalisé sur milieu non sélectif et seules les colonies « présentant un aspect faisant suspecter *Pseudomonas* » ont été analysées pour une identification par galerie Api®.

Les *Pseudomonas* constituent une flore complexe dont la taxonomie est en constante évolution. Nombre d'espèces ont été écartées du genre dont certaines peuvent présenter des caractères de pathogénicité pour l'homme (*Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, etc.) (Tayeb, Lefevre *et al.* 2008). Le genre *Pseudomonas stricto sensu* compte plus de 230 espèces. Les méthodes phénotypiques ne permettent pas de discriminer et d'identifier, jusqu'au niveau de l'espèce, ces micro-organismes dont la taxonomie évolue constamment.

Les données disponibles ne permettent pas de connaître avec certitude la nature des flores associées aux betteraves crues incriminées dans les TIAC. Les premières démarches d'identification font suspecter des *Pseudomonas* mais seules des analyses complémentaires devraient permettre d'obtenir une identification des micro-organismes contaminants.

#### **4.2.2. La contamination par *Pseudomonas* des betteraves crues est-elle supérieure à celle couramment trouvée pour les végétaux crus prêts à l'emploi ?**

La présence de *Pseudomonas* sur les betteraves crues râpées, à des concentrations de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> n'est pas étonnante. En effet, les *Pseudomonas* et les autres espèces proches sont des micro-organismes ubiquitaires présents dans les sols et les eaux. Leur association étroite avec certains végétaux est bien connue et varie selon les végétaux et, pour un même végétal, selon les cultivars et les pratiques agronomiques, mais également selon l'espèce de *Pseudomonas* et même selon les biotypes (Hamilton-Miller et Shah 2001; Rudi, Flateland *et al.* 2002). Ainsi, nombreux sont les auteurs qui ont décrit la présence, à forte densité, de *Pseudomonas* sur les végétaux, racines et feuilles, au stade de la récolte ou après leur transformation (Nguyen-the et Carlin 1994; Ramos, Miller *et al.* 2013; Zagory 1999). A titre d'exemple, Cliffe-Byrnes et Beirne (2005) ont dénombré les *Pseudomonas* spp. à des concentrations de l'ordre de  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> dans des mélanges céleri/carotte après parage et lavage et jusqu'à  $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup> après sept jours de conservation tandis qu'Amanatidou, Slump *et al.* (2000) ont retrouvé des concentrations de l'ordre de  $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> sur des carottes râpées analysées au

stade du conditionnement. Selon Allende, Luo *et al.* (2004), les concentrations en *Pseudomonas* spp. sont de l'ordre de  $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> sur les feuilles de salades vertes au stade de la récolte et de l'ordre de  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> sur des jeunes pousses d'épinards.

La présence de *Pseudomonas* à des concentrations aussi élevées sur les betteraves crues râpées n'est pas étonnante. Des concentrations similaires sont rencontrées chez d'autres végétaux crus destinés à la consommation humaine sans qu'aucun trouble gastrique associé n'ait été rapporté. Cependant, pour établir un lien avec les l'épisode de TIAC en Midi-Pyrénées, il n'est pas possible de s'affranchir d'une caractérisation des micro-organismes isolés. L'indice de diversité et la position taxonomique des isolats au niveau de l'espèce, tels que déterminés par une technique de biologie génomique, permettront d'émettre des hypothèses sur l'origine de la contamination et le risque associé. Ce point fait l'objet du travail réalisé à l'INRA d'Avignon et ne sera pas discuté plus avant.

#### 4.2.3. Les *Pseudomonas* ou flores apparentés peuvent-ils être responsables des troubles gastriques évoqués ?

Un rapport publié en octobre 2010 présente le travail spécifique réalisé par l'Anses sur l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de *Pseudomonas* spp. dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées) (Anses 2010). Dans le genre, *P. aeruginosa* est couramment considéré comme le seul agent pathogène pour l'Homme. Il est le second agent responsable d'infections nosocomiales et le premier responsable d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Ce micro-organisme fait l'objet de nombreux travaux et les mécanismes de sa virulence sont désormais bien décryptés (Balasubramanian, Schneper *et al.* 2013; de Bentzmann et Plesiat 2011). Dans la très grande majorité des cas décrits, les pathologies graves qu'il déclenche concernent les systèmes sanguins et respiratoires mais peu les pathologies digestives ou seulement restreintes aux patients soumis à des pressions prolongées par l'administration d'antibiotiques (Adlard, Kirov *et al.* 1998; Kim, Peck *et al.* 2001). Il convient néanmoins de mentionner le syndrome dit « fièvre de Shanghai », décrit dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, et qui toucherait principalement les enfants en bas âge (< 1 an) sans pathologie prédisposante. Ce syndrome entérique est caractérisé par des manifestations diarrhéiques associées à de la fièvre ou des lésions cutanées pouvant évoluer vers des complications morbides. Les *P. aeruginosa* associés à ce syndrome présentent des caractères d'adhérence et cytotoxiques plus importants que ceux des isolats associés à des pathologies respiratoires (Chuang, Wang *et al.* 2014).

Dans une récente étude (Allydice-Francis et Brown 2012), les auteurs ont dénombré et caractérisé les *P. aeruginosa* dans 95 végétaux crus (choux, choux rouges, carottes, concombres, laitues, patates douces, tomates) et des salades composées commercialisés en Jamaïque. Les échantillons présentaient des taux de contamination variant de 100 ufc.g<sup>-1</sup> à plus de  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup>, et les souches isolées présentaient des gènes de virulence spécifiant différentes fonctions associées à la cytotoxicité de ces micro-organismes. Les auteurs concluaient : « *P. aeruginosa* est un contaminant majeur des végétaux crus et pourrait être une source d'infection pour les personnes sensibles ».

Par opposition, très peu d'autres espèces (non *aeruginosa*) ont été étudiées quant à leur pouvoir pathogène pour l'Homme. En effet, la grande majorité des travaux de recherche concernent les *Pseudomonas* présentant un risque d'altération pour les aliments (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, etc.) ou un intérêt dans les domaines biotechnologiques et agricoles (*P. fluorescens*, *P.*

*putida*, *P. syringae*, *P. stutzeri*, etc.) (Silby *et al* 2011)<sup>3</sup>. Il s'agit donc principalement d'espèces psychrotrophes qui, *in vitro*, ne sont pas capables de se multiplier à 37°C. Pourtant, régulièrement et de plus en plus fréquemment, la présence d'autres espèces de *Pseudomonas* a été détectée dans des prélèvements humains et corrélée à des cas de bactériémies ou de pathologies touchant des personnes immunodéprimées ou présentant une fragilité suite à un acte chirurgical invasif, un traitement spécifique ou à une plaie. Les *Pseudomonas* incriminés sont alors considérés comme des pathogènes opportunistes. Il s'agit principalement des espèces suivantes (liste non exhaustive) : *alcaligenes*, *brassicacearum* (Wellinghausen, Kothe *et al.* 2005), *luteola* (Yousefi, Shoja *et al.* 2014), *fluva* (Rebolledo, Vu *et al.* 2014), *putida* (Timmis 2002), *stutzeri* (Scotta, Mulet *et al.* 2012b), *mendocina* (Bittar et Rolain 2010), *montelii* (Elomari, Coroler *et al.* 1997), *oryzihabitans* (Bhatawadekar 2013), etc. Très récemment, des études conduites *in vitro*, ont montré que certains *P. fluorescens*, couramment considérés comme ayant une température maximale de croissance inférieure à 35°C, étaient capables de mettre en place un processus adaptatif leur permettant de se développer à la température de 37°C (Chapalain, Rossignol *et al.* 2008). L'étude de certaines de ces souches a montré que ces bactéries étaient capables d'adhérer à des cellules nerveuses (Picot, Abdelmoula *et al.* 2001) ou épithéliales intestinales, de se transloquer au travers de l'épithélium et d'induire une réaction inflammatoire spécifique tout en synthétisant des quantités importantes de molécules à activité hémolytiques et cytotoxiques, en corrélation étroite avec la production de phospholipases (Madi, Lakhdari *et al.* 2010; Rossignol, Merieau *et al.* 2008). Ces travaux suggèrent l'existence, chez ces souches, de mécanismes de virulence similaires à ceux identifiés chez *P. aeruginosa* qui, selon les auteurs, expliqueraient la présence de *P. fluorescens* à haute activité hémolytique chez 57% des patients atteint de la maladie de Crohn, confirmant ainsi cette constatation faite par d'autres auteurs (Wagner, Short *et al.* 2008). Il faut noter qu'en 2013, la même équipe mettait en évidence des propriétés similaires chez des isolats cliniques de *P. mosselii* (Leneveu-Jenvrin, Madi *et al.* 2013). A ce jour, aucun lien entre des pathologies gastro-intestinales et l'ingestion d'aliments contenant des concentrations élevées en *Pseudomonas* n'a été rapporté, sachant pourtant que certains fromages par exemple, peuvent présenter des concentrations pouvant atteindre 10<sup>9</sup> cfu.g<sup>-1</sup> (élicitations d'experts).

Le pouvoir pathogène des *Pseudomonas stricto sensu* n'a été que très peu exploré puisqu'il ne concerne à ce jour que trois espèces parmi 230 (*aeruginosa*, *fluorescens*, *mosselii*). Cependant, l'absence de données ne permet pas d'écarter le risque et ce d'autant plus que des corrélations ont récemment été mises en évidence entre certaines pathologies digestives et certains *Pseudomonas* sans que les mécanismes n'aient été élucidés.

#### 4.2.4. Production de métabolites par *Pseudomonas* spp. et interrogation sur leur toxicité

La rapidité d'apparition des symptômes lors de TIAC associées à la consommation de betteraves crues râpées pourrait indiquer la présence d'un composé toxique dans l'aliment. Il convient donc de s'interroger sur la capacité de certaines espèces à produire des composés toxiques dans les aliments. Plusieurs espèces de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*) ont été

<sup>3</sup> Les *Pseudomonas* sont utilisés en biotechnologie avec la bioremédiation, la biodégradation, le traitement des effluents, etc., et en agriculture avec la stimulation de la croissance des plantes (biostimulation) ou la lutte contre les ravageurs et les maladies fongiques (bioprotection) (par enrobage des semences ou enrichissement de la rhizosphère).

étudiées pour leurs propriétés antagonistes des champignons phytopathogènes et leur utilisation comme agents de protection des plantes. Au moins pour une part, leur activité antifongique repose sur la production de métabolites secondaires, 2,4-diacetylphloroglucinol (Schnider-Keel, Seematter *et al.* 2000), pyolutéorine, pyrrolnitrine, phénazines (Ellis, Timms-Wilson *et al.* 2000; Frapoli, Pothier *et al.* 2012), cyanure d'hydrogène (Ellis, Timms-Wilson *et al.* 2000), lipopeptides (Nielsen, Sorensen *et al.* 2002; Nielsen et Sorensen 2003). Outre des composés antifongiques, *P. fluorescens* est aussi producteurs de l'antibiotique « mupirocine » (Martin et Simpson 1989).

L'activité de ces composés a surtout été étudiée sur des champignons phytopathogènes, mais quelques études ont montré une activité toxique du 2,4-diacetylphloroglucinol sur les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* (Gleeson, O'Gara *et al.* 2010) et sur des protozoaires (Jousset, Lara *et al.* 2006). En outre la pyoverdine, un sidérophore produit par *P. fluorescens*, pourrait être hépatotoxique sur le modèle souris (Eraso et Albesa 1998). Des phénazines sont aussi produites par *P. aeruginosa*. Certaines seraient toxiques sur le modèle *Caenorhabditis elegans* (Cezairliyan, Vinayavekhin *et al.* 2013) et joueraient un rôle dans la virulence (Denning, Iyer *et al.* 2003; Recinos, Sekedat *et al.* 2012). Certains des lipopeptides produits par les *Pseudomonas* spp. attaquent les membranes plasmiques et ont une activité hémolytique (Coraiola, Lo Cantore *et al.* 2006). Il n'est néanmoins pas possible de savoir si de tels lipopeptides sont à l'origine de l'activité hémolytique des *Pseudomonas* isolés des betteraves râpées crues impliquées dans les TIAC comme celle ayant eu lieu en Finlande (Jacks, Toikkanen *et al.* 2013).

La production des métabolites secondaires et des lipopeptides par *P. fluorescens* a surtout été étudiée dans le cadre de leur activité antifongique, dans le sol ou la rhizosphère des plantes. Des substances issues des végétaux auraient une activité inductrice sur leur synthèse, par exemple des exsudats de graines de betterave (Koch, Nielsen *et al.* 2002), mais leur production dans des végétaux transformés n'est pas connue.

Par ailleurs, l'hypothèse de production d'amines biogènes par les *Pseudomonas* au cours de leur multiplication sur les betteraves crues ne peut être rejetée. Plusieurs publications font état de cette possibilité (Lavizzari, Breccia *et al.* 2010; Lavizzari, Veciana-Nogues *et al.* 2007; Moret, Smela *et al.* 2005).

### **4.3. Présence de toxines produites par d'autres microorganismes**

#### **4.3.1. Substances toxiques d'origine bactérienne**

D'une façon générale, l'hypothèse microbienne serait compatible avec des TIAC survenant à partir de betteraves crues, râpées et conservées au froid avant consommation. La conservation au froid de la racine râpée doit favoriser la multiplication d'une microflore psychrotrophe, de type *P. fluorescens*, mais pas uniquement (par exemple, les espèces des genres *Pantoea* ou *Rhanella* font aussi partie de la microflore numériquement dominante). Celle-ci peut ainsi atteindre une population importante, et/ou produire une éventuelle toxine dans l'aliment avant consommation. Comme indiqué dans la partie 5.1.3, les *Bacillus*, autres que *B. cereus* peuvent aussi être impliqués. Pour expliquer que de telles TIAC n'aient jamais été observées avec d'autres végétaux crus prédécoupés, par exemple les carottes râpées, il faudrait cependant supposer que la croissance du microorganisme responsable et/ou la production de toxines, soient favorisées par la matrice végétale « racine de betterave râpée crue ».

#### 4.3.2. Substances toxiques d'origine fongique

Les champignons producteurs de mycotoxines les plus susceptibles de se développer sur des légumes racines appartiennent au genre *Fusarium* (Christ, Marlander *et al.* 2011). Les betteraves peuvent également être contaminées par des souches de moisissures du genre *Alternaria*, mais la toxicité des toxines d'*Alternaria* chez l'Homme étant peu documentée (EFSA 2011), il est difficile de se prononcer sur la plausibilité de cette piste.

Certains champignons ont également la faculté de synthétiser des molécules toxiques, différentes des mycotoxines, à partir de substances présentes dans la plante. C'est le cas de la patate douce dont des extraits se sont révélés toxiques pour le bétail (Doupnik, Jones *et al.* 1971; Wilson, Yang *et al.* 1970), les poulets (Doupnik, Jones *et al.* 1971; Peckham, Mitchell *et al.* 1972), et les souris (Boyd et Wilson 1972). Les principes toxiques seraient des furanoterpénoïdes, des ipoméanolés et de l'ipoméanine (Mawhinney, Woodger *et al.* 2008; Nelson, Toussoun *et al.* 1983) qui résulteraient de la dégradation par *Fusarium solani* de phytoalexines produites par la plante.

Les carottes peuvent être contaminées par des espèces de *Rhizopus*, par *Botrytis cinerea*, et par *Sclerotinia sclerotiorum*. La pourriture de carottes par *Fusarium avenaceum*, par *F. solani*, et par *Geotrichum candidum* a également été rapportée. Les patates douces peuvent être contaminées par de nombreuses moisissures dont la pourriture noire due à *Ceratocystis fimbriata*. En revanche, *Rhizopus stolonifer* et *Rhizopus oryzae* provoquent sur les patates douces des pourritures molles sans changement de couleur. Parmi les attaques de *Fusarium* sur les patates douces on citera *F. solani*, *F. oxysporum*, et *F. semitectum*. Le gingembre peut être attaqué par *F. oxysporum*, *Pythium*, et par *Sclerotium rolfsii*. Aucune information spécifique concernant la contamination fongique des betteraves rouges n'a été trouvée (Pitt et Hocking 2009).

La recherche de champignons toxigènes sur les produits consommés pourra se révéler infructueuse. En effet, le nettoyage et l'épluchage des betteraves peuvent éliminer le champignon, contrairement aux mycotoxines qui peuvent migrer et subsister à l'intérieur du produit. La recherche de *Penicillium* et aussi d'autres champignons sur la betterave râpée ne semble pas pertinente car la présence de champignons visibles sur l'aliment entraîne, en général, le rejet par le consommateur.

Le déoxynivalénol (DON) est un puissant émétisant et a déjà été incriminé dans des cas d'intoxications aiguës suite à la consommation de céréales. Les symptômes rapportés sont de type gastro-intestinaux et surviennent généralement dans les 30 minutes (Sobrova, Adam *et al.* 2010). Le DON est principalement produit par *Fusarium culmorum* et *F. graminearum*. Ces deux espèces contaminent généralement les céréales, rarement les betteraves. En revanche d'autres espèces de *Fusarium* comme *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoides* et *F. subglutinans* ont été isolées de betteraves sucrières contaminées. Il a de plus été montré que *F. equiseti*, espèce isolée le plus fréquemment (dans 42% des cas), produit très rarement du DON, mais au contraire de la zéaralénone ainsi que d'autres mycotoxines (Bosch et Mirocha 1992).

Pour les TIAC survenues en Alsace, dans le Nord-Pas-de-Calais et dans les Alpes-Maritimes, le DON avait été recherché, mais sans succès. Toutefois, la recherche de toxines produites par les champignons pour ces TIAC ne devrait pas se limiter à la DON. Dans la TIAC survenue en août dans les Alpes-Maritimes, la zéaralénone et la toxine T-2, dont les effets émétiques respectivement sur les espèces animales (Ueno 1977) et sur l'Homme (Agag 2005) ont été rapportés, ont également été recherchées, mais sans succès.

La recherche, à l'aveugle, des différentes mycotoxines ou autres métabolites produits par des champignons ne semble pas une approche appropriée. Il est suggéré dans un premier temps,

d'isoler et d'identifier les champignons sur les betteraves contaminées non lavées et non épluchées. Si le responsable de la contamination est un champignon, on recherchera plutôt *Fusarium spp.* qu'*Aspergillus spp.*, les toxines étant produites soit au champ, soit lors du stockage des betteraves. Dans un deuxième temps, il sera nécessaire de répertorier les toxines produites par les champignons isolés et de les rechercher dans le produit fini.

#### **4.4. Présence de substances toxiques dans les betteraves et autres végétaux crus**

##### **4.4.1. Hypothèse d'une contamination chimique des betteraves**

###### **▪ Contamination par des fluides frigorigènes**

Les fluides frigorigènes sont composés de multiples substances, seules ou en mélange (INRS 2005). Il peut s'agir de :

- composés inorganiques purs : ammoniac, eau, dioxyde de carbone,
- hydrocarbures : cyclopropane, propane, butane, isopropène, propylène,
- hydrocarbures halogénés : chlorofluorocarbures (CFC), hydrochlorofluorocarbures (HCFC), hydrofluorocarbures (HFC),
- autres produits : étherdiméthylque, étherdiéthylque, méthylamine, éthylamine, éthanol, méthanol, bromochloro-difluorométhane, bromotrifluorométhane.

La contamination des denrées alimentaires est possible dans le cas d'une fuite du système de réfrigération. En effet, en 1985 aux Etats-Unis, 20 enfants ont été intoxiqués suite à la consommation de lait contaminé par de l'ammoniac. Les concentrations d'ammoniac mesurées dans le lait variaient de 530 mg/kg à 1524 mg/kg. La contamination était imputable à une fuite du système de réfrigération du distributeur. Des troubles de type irritation du système digestif (bouche, gorge, ventre), se sont manifestés environ 1 heure après la consommation du lait contaminé (CDC 1986). De même, en 2002 aux Etats-Unis, 157 élèves et enseignants ont été intoxiqués suite à la consommation de bâtonnets de poulets contaminés par de l'ammoniac. Les concentrations d'ammoniac mesurées dans le poulet cuit variaient de 880 mg/kg à 1076 mg/kg. Les symptômes se sont manifestés rapidement (1 à 3 heures après la consommation) par des douleurs abdominales (dans 82% des cas), maux de tête (dans 61% des cas), nausées (dans 41% des cas) et vomissements (dans 23% des cas) (Dworkin, Patel *et al.* 2004).

La survenue rapide de troubles digestifs est cohérente avec l'hypothèse d'une contamination des betteraves par de l'ammoniac. Cependant, les effets de l'ammoniac semblent plutôt être de type irritant ce qui n'est pas en adéquation avec l'ensemble des symptômes décrits par les consommateurs de betteraves. Par ailleurs, les aliments contaminés par de l'ammoniac se caractérisent en général par un goût rance ce qui ne semble pas avoir été rapporté par les personnes impliquées dans les TIAC faisant l'objet de cette saisine (Hagyard, Keiller *et al.* 1993).

Aucun autre cas d'intoxication faisant suite à la contamination de denrées alimentaires par un fluide frigorigène n'a été relaté dans la littérature. Toutefois, les hydrocarbures à courte chaîne comme ceux contenus dans les fluides frigorigènes sont réputés peu toxiques (INRS 2005). De plus, la toxicité aiguë, par voie orale ou par inhalation, des hydrocarbures halogénés est décrite comme faible (Dekant 1996). En ce qui concerne les autres substances entrant dans la composition des fluides frigorigènes, les amines aliphatiques comme l'éthylamine occasionneraient par inhalation, des troubles de type irritant (INRS 2013). Les effets toxiques du méthanol et de l'éthanol par ingestion porteraient sur le système nerveux central (SNC) (INRS 2009; INRS 2011).

L'étherdiméthylque et l'étherdiéthylque ne seraient quant à eux plus utilisés comme fluides frigorigènes (INRS 2005).

Certaines des substances entrant dans la composition des fluides frigorigènes semblent peu toxiques ou bien peuvent être à l'origine de symptômes peu concordants avec ceux constatés suite aux intoxications liées à la consommation de betteraves crues râpées. Cependant, face à la variété des mélanges de substances utilisées, et cette recherche bibliographique n'étant pas exhaustive, toutes les substances entrant dans la composition des fluides frigorigènes n'ont pu être investiguées. De plus, les données toxicologiques relatives à ces substances sont rares et concernent le plus souvent des cas de contamination par voie aérienne. Ainsi, le manque de données toxicologiques (plus particulièrement par voie orale) ne permet pas de rejeter totalement l'hypothèse d'une contamination des betteraves par des fluides frigorigènes. En effet, il ne peut pas être exclu que certaines de ces substances puissent, selon la dose d'exposition, provoquer des troubles digestifs. Toutefois, les lots de betteraves incriminés dans les TIAC n'ont pas la même origine et ont donc suivi des circuits de distribution différents ce qui ne concorde pas avec l'hypothèse d'une contamination par le circuit de réfrigération qui se traduirait par des épisodes d'intoxications plus localisés et ponctuels.

#### ▪ Contamination par des pesticides

Dans une école londonienne, 50 enfants répartis sur plusieurs sites, ont été intoxiqués suite à la consommation de concombres contaminés. Les troubles occasionnés sont survenus rapidement (au bout de 30 minutes) et étaient de type gastro-intestinal (vomissements, crampes abdominales, nausées). L'aldicarbe, un insecticide de la famille des carbamates, a été identifié comme l'agent causal le plus probable (Aldous, Ellam *et al.* 1994). D'autres cas d'intoxications observées à la suite de la consommation de pastèques contaminées par de l'aldicarbe ont également été rapportés aux Etats-Unis. Les troubles sont survenus très rapidement (dans les 30 minutes) et étaient de types gastro-intestinaux (nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhées) et extra gastro-intestinaux (dysarthrie, diaphorèse, vertiges, etc.) (Green, Heumann *et al.* 1987). L'aldicarbe peut donc provoquer des troubles similaires à ceux constatés suite à la consommation de ces betteraves crues.

En 1999 aux Etats-Unis, 26 personnes ont été intoxiquées après avoir consommé un repas dans un restaurant. Les premiers troubles sont survenus environ 40 minutes après le repas. Les symptômes rapportés étaient de types gastro-intestinaux (vomissements, crampes abdominales, nausées) et neurologiques (maux de tête, frissons, vertiges). Les investigations ont permis d'identifier que les clients avaient consommé des aliments assaisonnés avec du sel contaminé par du méthomyl (Buchholz, Mermin *et al.* 2002). Le méthomyl est un insecticide de la famille des carbamates. Cette substance active a été approuvée au niveau européen pour des usages sur cucurbitacées et tomates, avec des restrictions de doses d'emploi (Directive CE n°2009/115 2009; EFSA 2008a). La limite maximale de résidus (LMR) de méthomyl est fixée à 0,02 mg/kg dans la tomate. Pour information, le méthomyl a la même LMR dans les betteraves (EU Pesticides database<sup>4</sup>).

Les données bibliographiques suggèrent que certains pesticides appartenant à la famille des carbamates (aldicarbe et méthomyl) pourraient provoquer des troubles similaires à ceux constatés chez les personnes intoxiquées suite à la consommation de betteraves. L'aldicarbe et le méthomyl

<sup>4</sup> [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/?event=homepage](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage)

font partie de la liste des substances actives recherchées par le SCL dans les échantillons de betteraves incriminés. Les résultats des analyses réalisées sur les échantillons de betteraves incriminés sont tous conformes aux LMR fixées pour de nombreuses substances actives. Par ailleurs, les principales substances actives appartenant à la famille des carbamates ont également été recherchées (carbaryl, carbendazime, carbétamide, carbofuran, méthomyl, tri-allate, pyrimicarbe, fénoxy-carbe, propoxur) et les résultats sont conformes aux LMR en vigueur. L'hypothèse d'une contamination des betteraves crues par des résidus de pesticides peut être écartée.

#### ▪ Contamination par des résidus de chlore

La réglementation autorise l'utilisation de chlore, sous forme de chlore gazeux ou d'hypochlorite de sodium, pour la décontamination des fruits et légumes. Il peut être utilisé à hauteur de 80 ppm dans le bain de chloration ; toutefois le rinçage des fruits et légumes traités est obligatoire<sup>5</sup>.

L'ingestion accidentelle d'une solution commerciale d'agent de décontamination à l'hypochlorite de sodium est cause d'empoisonnement courant chez les jeunes enfants. Il a également souvent été fait état de l'ingestion intentionnelle de cette solution chez les adultes. Les empoisonnements ont provoqué des effets toxiques de gravité variable, dont l'irritation des muqueuses, la nausée, les vomissements, la diarrhée, les brûlures de l'œsophage et du tube digestif, l'acidose, voire la mort. Ces effets semblent toutefois être dus principalement à la présence concomitante d'autres produits chimiques ou à l'extrême alcalinité de la solution. Par ailleurs, chez l'Homme, aucun effet adverse n'a été constaté suite à l'ingestion d'eau contenant jusqu'à 50 mg de chlore/litre (Santé Canada 2009). Les données bibliographiques suggèrent que l'ingestion de grandes quantités de chlore pourrait provoquer des troubles digestifs divers. Les betteraves crues ayant fait l'objet d'un traitement au chlore, un surdosage accidentel ne peut pas être totalement exclu.

#### 4.4.2. Substances toxiques naturellement présentes dans les betteraves

##### ▪ Nitrates/nitrites

Certains végétaux comme les épinards, la laitue et les betteraves contiennent naturellement des teneurs élevées en nitrates. En Europe, des teneurs maximales en nitrate sont fixées dans les épinards et la laitue<sup>6</sup>. Les betteraves ne sont pas concernées par cette réglementation mais elles contiennent naturellement plus de 1000 mg/kg de nitrates. Les concentrations de nitrates dans les légumes dépendent de différents paramètres tels que l'espèce, les conditions environnementales (saison, luminosité, température) et les modes de culture (fertilisants utilisés). Les niveaux de nitrites dans des légumes intacts sont généralement faibles. Toutefois, à la suite d'une contamination bactérienne post-récolte, les nitrates peuvent être convertis en nitrites, sous l'action de bactéries nitrate-réductrices. Une étude réalisée sur des pommes de terre, montre que les traitements thermiques (cuisson à l'eau, à la vapeur, microondes) entraînent une forte réduction de la quantité de nitrates (de 16 à 62%) et de nitrites (de 62 à 98%) dans le légume (EFSA 2008b). Après ingestion, dans le tractus gastro-intestinal, 4 à 8% des nitrates sont convertis en nitrites qui sont responsables des effets toxiques chez l'Homme. En effet, en se liant avec l'hémoglobine, les nitrites altèrent leur structure chimique (formation de méthémoglobine) et perturbent l'acheminement du dioxygène vers les tissus, provoquant ainsi une hypoxémie. L'intoxication aiguë, par ingestion, se manifeste, en général, par un bleuissement de la peau (cyanose) et une

<sup>5</sup> Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

<sup>6</sup> Règlement (CE) 1881/2006

asphyxie. Les enfants âgés de 0 à 3 mois sont particulièrement sensibles et peuvent souffrir d'une pathologie connue sous le nom de « *syndrome du bébé bleu* ». Enfin, il est à noter qu'afin de tenir compte des effets chroniques des nitrates et nitrites, le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA) a fixé une dose journalière admissible (DJA) de 3,7 mg.kg pc<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour les nitrates et de 0,07 mg.kg pc<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour les nitrites (EFSA 2010; Règlement (UE) No 257/2010 2010). Les symptômes les plus courants d'une intoxication aux nitrates ou aux nitrites ne semblent pas concordants avec ceux constatés à la suite de la consommation de betteraves. En effet, dans une étude de biodisponibilité effectuée sur 12 volontaires recevant oralement 7 à 10,5 g de nitrate d'ammonium (équivalent à 78-116 mg.kg pc<sup>-1</sup>), deux personnes ont souffert de nausées et de vomissements environ six heures après l'ingestion (van Velzen, Sips *et al.* 2008). Même si la chronologie n'est pas cohérente, au vu du faible nombre de données, il n'est pas totalement exclu que, dans certaines conditions et selon la dose ingérée, les nitrates puissent provoquer des troubles similaires à ceux constatés lors des TIAC survenues en France, faisant l'objet de cette saisine.

#### ▪ Oxalates

Certains végétaux comme la rhubarbe, les épinards et les betteraves contiennent naturellement des teneurs élevées en oxalate. Dans la betterave, l'oxalate est principalement concentré dans les feuilles mais les racines peuvent en contenir de 3 à 6 g.kg<sup>-1</sup> de masse fraîche (Chai et Liebman 2005). Certaines conditions environnementales comme la sécheresse, la maturation, pourraient favoriser l'accumulation d'oxalate dans les légumes. La teneur totale en oxalate dans les produits alimentaires se compose d'une quantité d'oxalate soluble et d'une quantité d'oxalate insoluble. La biodisponibilité de l'oxalate est relativement faible chez l'Homme (0,7% à 4,5%) (Barceloux 2008). Toutefois, l'oxalate soluble ayant une biodisponibilité plus élevée, ses effets adverses potentiels sur la santé sont par conséquent également plus élevés. Enfin il a été démontré que la cuisson de légumes à l'eau peut réduire leur teneur en oxalate (Noonan et Savage 1999; Siener, Honow *et al.* 2006).

Après ingestion, l'oxalate a une action irritante sur le tractus gastro-intestinal et contribue à diminuer la biodisponibilité du calcium, du magnésium et d'autres cations divalents par chélation de ces minéraux. L'oxalate est également à l'origine de la formation de cristaux d'oxalate de calcium dans les reins pouvant conduire à terme à une néphropathie et à la formation de calculs rénaux (Noonan et Savage 1999).

Les cas cliniques d'intoxications à l'oxalate sont rares. Toutefois, l'ingestion de feuilles de rhubarbe riches en oxalate a pu provoquer, chez des enfants, des troubles gastro-intestinaux de faible gravité (vomissements, diarrhées) qui se sont résorbés rapidement. Ces symptômes, résultant de l'irritation du tractus gastro-intestinal, débutent en général environ 2 à 12 heures après ingestion d'oxalate (Barceloux 2008). L'ingestion volontaire d'oxalate aurait provoqué, chez une personne, des vomissements et des crampes abdominales immédiatement après ingestion, suivis d'une néphropathie aiguë (Dassanayake et Gnanathan 2012). Bien qu'aucun cas d'intoxication à l'oxalate survenu suite à la consommation de betteraves n'ait été répertorié, les données bibliographiques suggèrent que la betterave peut contenir des teneurs élevées d'oxalate principalement dans les feuilles et que cette substance peut provoquer, après ingestion, des troubles intestinaux semblables à ceux constatés lors des TIAC survenues en France.

▪ **Saponines triterpéniques**

Les betteraves sucrières pourraient contenir de l' $\alpha$ -solanine qui est une saponine stéroïdique (Dolan, Matulka *et al.* 2010; Tice 1998). Cette substance a déjà été à l'origine d'intoxications alimentaires liées à la consommation de pommes de terre et peut provoquer des troubles intestinaux similaires à ceux constatés lors des TIAC liées à la consommation de betterave (Noah 1985; Tice 1998). Cependant l' $\alpha$ -solanine est plutôt associée aux solanacées (et plus particulièrement à la pomme de terre) et sa présence dans les betteraves est très peu documentée.

En revanche, les betteraves contiennent des saponines triterpéniques (De Geyter, Lambert *et al.* 2007). D'après une étude récente, la betterave rouge contiendrait en effet plusieurs saponines constituées d'une base aglycone de type acide oléanolique ou hédéragénine (Mroczek, Kapusta *et al.* 2012). Une autre publication a mis en avant certaines propriétés anti-inflammatoires et une action anticancéreuse de l'acide oléanolique (Lucio, Rocha Gda *et al.* 2011). Toutefois, la consommation de feuilles de betteraves sucrières, relativement riches en saponine (environ 6 g/kg en saponines totales), pourrait être à l'origine d'intoxications chez certains animaux de rente (EFSA 2009). Les données toxicologiques relatives à ces substances sont rares et il ne peut donc pas être exclu que certaines saponines de la betterave puissent être toxiques pour l'homme.

Ainsi, la composition des betteraves en saponine et la toxicité de ces dernières étant relativement peu documentées, il ne peut pas être exclu que les betteraves incriminées puissent contenir des saponines potentiellement toxiques, en teneurs suffisamment élevées pour provoquer des troubles gastro-intestinaux.

Des données peu précises suggèrent que les nitrates/nitrites, l'oxalate et certaines saponines pouvant être naturellement présentes dans les betteraves, pourraient provoquer des troubles gastro-intestinaux après leur ingestion. La réalisation d'analyses chimiques ciblant ces substances pourrait permettre de confirmer ou infirmer ces différentes pistes.

#### **4.5. Conclusions**

Les symptômes (troubles digestifs) décrits lors des épisodes de TIAC faisant l'objet de ce rapport, se sont révélés peu spécifiques et peu discriminants. Néanmoins, la rapidité de leurs apparitions devrait permettre d'orienter plutôt les investigations vers une origine toxique ou chimique de la contamination.

Certaines de ces pistes ont d'ores et déjà pu être infirmées par les résultats des analyses effectuées sur les lots de betteraves incriminés dans les TIAC. Toutefois, compte-tenu de l'hétérogénéité des contaminations par les toxines, il est possible que les échantillons analysés ne soient pas représentatifs des aliments consommés.

Suite à cette expertise, les analyses complémentaires suivantes pourraient dans un premier temps être réalisées :

- Sur la matière première (betterave crue non lavée et non épluchée), réaliser des recherches sur les moisissures – en particulier des *Fusarium spp.*
- Sur les aliments incriminés, réaliser des recherches de :
  - *Pseudomonas*  $\beta$  hémolytiques, y compris des amines biogènes qu'ils pourraient produire ;

- Lipopeptides (produits par des *Bacillus* autres que *B. cereus* et par *P. fluorescens*),
- Nitrates /nitrites, oxalate, saponines.

Cependant, d'autres agents n'ayant jusqu'à présent pas suscité de notification d'intoxications alimentaires, et encore inconnus, pourraient être responsables des intoxications faisant l'objet de la présente note. Par conséquent pour aller plus loin dans cette investigation, notamment si les pistes précédentes s'avéraient infructueuses, les actions suivantes pourraient être réalisées :

- La mise en œuvre d'une méthode de recherche sans *a priori* de microorganismes potentiellement responsables de la production de composés toxiques. Cette démarche consisterait à comparer, notamment *via* un séquençage direct ou une étude métagénomique, les populations microbiennes dominantes dans les échantillons de betteraves crues râpées impliquées dans les TIAC à celle d'échantillons de betteraves standards ;
- La réalisation d'une analyse fine du circuit d'approvisionnement des betteraves afin de déterminer à quelle étape de la filière d'approvisionnement une anomalie aurait pu avoir lieu (contamination chimique, conditions favorables à la présence de saponines, oxalate, etc.) et ainsi faciliter l'identification de l'agent chimique en cause ;
- La mise en œuvre d'une analyse non ciblée des contaminants chimiques, notamment *via* les méthodes de HPLC-SM et CPG-SM, à partir des échantillons de betteraves crues râpées impliquées dans les TIAC.

Ces éventuels dangers identifiés lors des actions menées sur les échantillons de betteraves crues responsables des TIAC, s'ils correspondent à des dangers mal connus devraient dans l'idéal être complétés par des tests de toxicité.

Le comité d'experts spécialisé souligne le fait que la betterave potagère est un légume consommé traditionnellement cuit depuis des générations. Cet usage pourrait être fondé sur une connaissance profane de certains risques potentiellement associés à la consommation de betteraves crues. Par prudence, il pourrait être recommandé, en attendant une meilleure compréhension des phénomènes observés, de ne pas servir de betteraves crues râpées dans les restaurants collectifs des établissements d'enseignement et des maisons de retraite, solution adoptée en Finlande avec succès.

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

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions et recommandations finales du CES Biorisk.

Marc Mortureux

## **MOTS-CLES**

Betteraves crues, betteraves potagères, végétaux crus, épidémiologie, TIAC, Pseudomonas, toxines.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ackers ML, Mahon BE, *et al.* (1998) An outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**(6), 1588-93. [In eng]
- Adlard PA, Kirov SM, Sanderson K, Cox GE (1998) Pseudomonas aeruginosa as a cause of infectious diarrhoea. *Epidemiol Infect* **121**(1), 237-41. [In eng]
- Agag BI (2005) Mycotoxins in foods and feeds 5-Trichotecenes A-T-2 Toxin. Ass. Univ. Bull. *Environ. Res* **8**, 107-124.
- Aldous JC, Ellam GA, Murray V, Pike G (1994) An outbreak of illness among schoolchildren in London: toxic poisoning not mass hysteria. *J Epidemiol Community Health* **48**(1), 41-5. [In eng]
- Allende A, Luo Y, McEvoy JL, Artés F, Wang CY (2004) Microbial and quality changes in minimally processed baby spinach leaves stored under super atmospheric oxygen and modified atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* **33**(1), 51-59.
- Allydice-Francis K, Brown PD (2012) Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in Pseudomonas aeruginosa Associated with Fresh Vegetables. *International Journal of Microbiology* **2012**, 7.
- Amanatidou A, Slump RA, Gorris LGM, Smid EJ (2000) 'High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots.' (Wiley: Hoboken, NJ, ETATS-UNIS)
- Andreani NA, Martino ME, Fasolato L, Carraro L, Montemurro F, Mioni R, Bordin P, Cardazzo B (2014) Tracking the blue: A MLST approach to characterise the Pseudomonas fluorescens group. *Food Microbiology* **39**(0), 116-126.
- Angulo FJ, Getz J, *et al.* (1998) A large outbreak of botulism: the hazardous baked potato. *J Infect Dis* **178**(1), 172-7. [In eng]
- Anonymous (1979) Potato Poisoning. *Lancet* **2**(8144), 681-681.
- Anonymous (2004) Hepatitis A outbreak associated with green onions at a restaurant - Monaca, Pennsylvania, 2003. *Annals of Emergency Medicine* **43**(5), 660-662.
- Anonymous (2006) Multiple outbreaks of gastrointestinal illness among school children associated with consumption of flour tortillas - Massachusetts, 2003-2004. . *Morbidity and Mortality Weekly Report* **55**((01)), 8-11.
- Anonymous (2014) Cyclosporiasis Outbreaks Traced to Salad Mix and Cilantro in Salsa. *Jama-Journal of the American Medical Association* **311**(2), 129-129.
- Anses (2010) Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de Pseudomonades dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées) : <https://www.anses.fr/fr/documents/EAUX2008sa0117.pdf>. *Edition scientifique*, pp 85.
- Anses AST n°2014-SA-0115 (2014) Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux intoxications liées à la consommation de tomates cerise en provenance du Maroc. p. 13.
- Apetroaie-Constantin C, Mikkola R, Andersson MA, Teplova V, Suominen I, Johansson T, Salkinoja-Salonen M (2009) Bacillus subtilis and B. mojavensis strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *J Appl Microbiol* **106**(6), 1976-85. [In eng]
- Arnaut-Rollier I, De Zutter L, Van Hoof J (1999) Identities of the Pseudomonas spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology* **48**(2), 87-96.

- Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K (2013) A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* **41**(1), 1-20. [In eng]
- Barceloux DG (2008) 'Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals.' (John Wiley and Sons)
- Behravesh CB, Blaney D, *et al.* (2012) Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with consumption of restaurant tomatoes, USA, 2006: hypothesis generation through case exposures in multiple restaurant clusters. *Epidemiol Infect* **140**(11), 2053-61. [In eng]
- Bernard H, Faber M, *et al.* (2014) Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Euro Surveill* **19**(8), 20719. [In eng]
- Bhatawadekar S (2013) Community-Acquired urinary tract infection by *pseudomonas oryzihabitans*. *Journal of Global Infectious Diseases* **5**(2), 82-84.
- Bittar F, Rolain JM (2010) Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* **16**(7), 809-820.
- Bosch U, Mirocha CJ (1992) Toxin production by *Fusarium* species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Appl Environ Microbiol* **58**(10), 3233-9. [In eng]
- Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Boddingtonhaus B, Altwegg M, Bottger EC (2006) 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **44**(4), 1359-66. [In eng]
- Boyd MR, Wilson BJ (1972) Isolation and characterization of 4-ipomeanol, a lung-toxic furanoterpenoid produced by sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). *J Agric Food Chem* **20**(2), 428-30. [In eng]
- Buchholz U, Mermin J, *et al.* (2002) An outbreak of food-borne illness associated with methomyl-contaminated salt. *JAMA* **288**(5), 604-10. [In eng]
- CDC (1986) Epidemiologic Notes and Reports: Ammonia Contamination in a Milk Processing Plant -- Wisconsin. U.S. Dept. of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Grenfell-Lee D, Yuen GJ, Saghatelian A, Ausubel FM (2013) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* **9**(1), e1003101. [In eng]
- Chai W, Liebman M (2005) Effect of different cooking methods on vegetable oxalate content. *J Agric Food Chem* **53**(8), 3027-30. [In eng]
- Chan TY (2014) Aconitum Alkaloid Poisoning Related to the Culinary Uses of Aconite Roots. *Toxins (Basel)* **6**(9), 2605-2611. [In Eng]
- Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, Meyer JM, Orange N, Feuilloley MG (2008) Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol* **54**(1), 19-27. [In eng]
- Christ DS, Marlander B, Varrelmann M (2011) Characterization and mycotoxigenic potential of *Fusarium* species in freshly harvested and stored sugar beet in Europe. *Phytopathology* **101**(11), 1330-7. [In eng]
- Christensen H, Poulsen LK (1994) Detection of *pseudomonas* in soil by rRNA targeted in situ hybridization. *Soil Biology and Biochemistry* **26**(8), 1093-1096.

- Chuang CH, Wang YH, *et al.* (2014) Shanghai fever: a distinct *Pseudomonas aeruginosa* enteric disease. *Gut* **63**(5), 736-43. [In eng]
- Cliffe-Byrnes V, Beirne DO (2005) The effects of cultivar and physiological age on quality and shelf-life of coleslaw mix packaged in modified atmospheres. *International Journal of Food Science & Technology* **40**(2), 165-175.
- Coraiola M, Lo Cantore P, Lazzaroni S, Evidente A, Iacobellis NS, Dalla Serra M (2006) WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1758**(11), 1713-22. [In eng]
- Dassanayake U, Gnanathasan CA (2012) Acute renal failure following oxalic acid poisoning: a case report. *J Occup Med Toxicol* **7**(1), 17. [In eng]
- de Bentzmann S, Plesiat P (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol* **13**(7), 1655-65. [In eng]
- De Geyter E, Lambert E, Geelen D, Smagghe G (2007) Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. *PEST TECHNOLOGY* **1**(2), 96-105.
- Dekant W (1996) Toxicology of chlorofluorocarbon replacements. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 1**, 75-83. [In eng]
- Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE (2003) Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(3), L584-92. [In eng]
- Directive CE n°2009/115 (2009) Directive n° 2009/115/CE du 31/08/09 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire la substance active méthomyl (JOUE n° L 228 du 1er septembre 2009).
- Dogan B, Boor KJ (2003) Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Appl Environ Microbiol* **69**(1), 130-138.
- Dolan LC, Matulka RA, Burdock GA (2010) Naturally occurring food toxins. *Toxins (Basel)* **2**(9), 2289-332. [In eng]
- Doulgeraki AI, Nychas GJ (2013) Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiol* **34**(1), 62-9. [In eng]
- Douppnik B, Jones OH, Peckham (1971) Toxic *Fusaria* isolated from moldy sweet potatoes involved in an epizootic of atypical interstitial pneumonia in cattle. *J.C. Phytopathology*. **61**(890).
- Dunn RA, Hall WN, Altamirano JV, Dietrich SE, Robinson-Dunn B, Johnson DR (1995) Outbreak of *Shigella flexneri* linked to salad prepared at a central commissary in Michigan. *Public Health Rep* **110**(5), 580-6. [In eng]
- Dworkin MS, Patel A, Fennell M, Vollmer M, Bailey S, Bloom J, Mudahar K, Lucht R (2004) An outbreak of ammonia poisoning from chicken tenders served in a school lunch. *J Food Prot* **67**(6), 1299-302. [In eng]
- EFSA (2008a) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance methomyl, EFSA Scientific Report (2008) 222. 1-99.
- EFSA (2008b) Scientific Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission to perform a scientific risk assessment on nitrate in vegetables. *Journal number*, 689, 1-79.

- EFSA (2009) Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Saponins in *Madhuca Longifolia* L. as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* (2009) 979, 1-36.
- EFSA (2010) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS) . Statement on nitrites in meat products. *EFSA Journal* 2010; 8(5):1538 [12 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1538; Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- EFSA (2011) Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 2011;9(10):2407 [97 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2011.2407; Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- Ellis RJ, Timms-Wilson TM, Bailey MJ (2000) Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environ Microbiol* 2(3), 274-84. [In eng]
- Elomari M, Coroler L, Verhille S, Izard D, Leclerc H (1997) 'Pseudomonas monteillii sp. nov., isolated from clinical specimens.' (Society for General Microbiology: Reading, ROYAUME-UNI)
- Eraso AJ, Albesa I (1998) Elevation of alanine amino transferase and aspartate amino transferase produced by pyoverdinin, a photolabile pigment of *Pseudomonas fluorescens*. *Nat Toxins* 6(2), 61-5. [In eng]
- Ethelberg S, Lisby M, *et al.* (2010) Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveill* 15(6). [In eng]
- Finkelstein E, Afek U, Gross E, Aharoni N, Rosenberg L, Halevy S (1994) An outbreak of phytophotodermatitis due to celery. *Int J Dermatol* 33(2), 116-8. [In eng]
- Frapolli M, Pothier JF, Defago G, Moenne-Loccoz Y (2012) Evolutionary history of synthesis pathway genes for phloroglucinol and cyanide antimicrobials in plant-associated fluorescent pseudomonads. *Mol Phylogenet Evol* 63(3), 877-90. [In eng]
- From C, Hormazabal V, Granum PE (2007) Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int J Food Microbiol* 115(3), 319-24. [In eng]
- From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE (2005) Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 71(3), 1178-83. [In eng]
- Garcia-Cairasco N, Moyses-Neto M, *et al.* (2013) Elucidating the neurotoxicity of the star fruit. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(49), 13067-70. [In eng]
- Garcia RA, Hotchkiss JH, Steinkraus KH (1999) The effect of lipids on bongkrekic (Bongkrek) acid toxin production by *Burkholderia cocovenenans* in coconut media. *Food Addit Contam* 16(2), 63-9. [In eng]
- Gaul LK, Farag NH, Shim T, Kingsley MA, Silk BJ, Hyytia-Trees E (2013) Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery--Texas, 2010. *Clin Infect Dis* 56(1), 20-6. [In eng]
- Gilbert RJ, Kramer JM (1984) *Bacillus cereus* enterotoxins: present status. *Biochem Soc Trans* 12(2), 198-200. [In eng]
- Gleeson O, O'Gara F, Morrissey JP (2010) The *Pseudomonas fluorescens* secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97(3), 261-73. [In eng]
- Green MA, Heumann MA, *et al.* (1987) An outbreak of watermelon-borne pesticide toxicity. *Am J Public Health* 77(11), 1431-4. [In eng]
- Hagyard CJ, Keiller AH, Cummings TL, Chrystall BB (1993) Frozen storage conditions and rancid flavour development in lamb. *Meat Sci* 35(3), 305-12. [In eng]

- Hamilton-Miller JMT, Shah S (2001) Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**(1), 81-83.
- Herbland A, El Zein I, Valentino R, Cassinotto C, Meunier C, Rieux D, Mehdaoui H (2009) Star fruit poisoning is potentially life-threatening in patients with moderate chronic renal failure. *Intensive Care Med* **35**(8), 1459-63. [In eng]
- INRS (2005) L'institut national de recherche et de sécurité (INRS). ED 69 Aide-mémoire technique.
- INRS (2009) Fiche toxicologique du méthanol 1-8.
- INRS (2011) Fiche toxicologique de l'éthanol. 1-8.
- INRS (2013) Fiche toxicologique de l'éthylamine. 1-6.
- Jacks A, Toikkanen S, *et al.* (2013) Raw grated beetroot linked to several outbreaks of sudden-onset gastrointestinal illness, Finland 2010. *Epidemiol Infect* **141**(8), 1640-6. [In eng]
- Jalava K, Hakkinen M, Valkonen M, Nakari UM, Palo T, Hallanvuo S, Ollgren J, Siitonen A, Nuorti JP (2006) An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Infect Dis* **194**(9), 1209-16. [In eng]
- Jiao Z, Kawamura Y, Mishima N, Yang R, Li N, Liu X, Ezaki T (2003) Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B. gladioli*. *Microbiol Immunol* **47**(12), 915-25. [In eng]
- Jousset A, Lara E, Wall LG, Valverde C (2006) Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* **72**(11), 7083-90. [In eng]
- Kim SW, Peck KR, Jung SI, Kim YS, Kim S, Lee NY, Song JH (2001) 'Pseudomonas aeruginosa as a potential cause of antibiotic-associated diarrhea.' 742-4
- Koch B, Nielsen TH, Sorensen D, Andersen JB, Christophersen C, Molin S, Givskov M, Sorensen J, Nybroe O (2002) Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* **68**(9), 4509-16. [In eng]
- Lavizzari T, Breccia M, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC, Veciana-Nogues MT (2010) Histamine, cadaverine, and putrescine produced in vitro by enterobacteriaceae and pseudomonadaceae isolated from spinach. *J Food Prot* **73**(2), 385-9. [In eng]
- Lavizzari T, Veciana-Nogues MT, Weingart O, Bover-Cid S, Marine-Font A, Vidal-Carou MC (2007) Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. *J Agric Food Chem* **55**(23), 9514-9. [In eng]
- Leneveu-Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Feuilloley M, Chevalier S, Connil N (2013) Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. *BMC Microbiol* **13**, 123. [In eng]
- Lucio KA, Rocha Gda G, Moncao-Ribeiro LC, Fernandes J, Takiya CM, Gattass CR (2011) Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo. *PLoS ONE* **6**(12), e28596. [In eng]
- MacDonald E, Heier BT, *et al.* (2012) *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with ready-to-eat salad mix, Norway, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**(9), 1496-9. [In eng]

- Madi A, Lakhdari O, *et al.* (2010) The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol* **10**(1), 215.
- Marchand S, Vandriesche G, *et al.* (2009) Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *Int J Food Microbiol* **133**(1–2), 68-77.
- Martin FM, Simpson TJ (1989) Biosynthetic studies on pseudomonic acid (mupirocin), a novel antibiotic metabolite of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* **1**(1), 207-209.
- Martin WJ, Hasling VC, Catalano EA, Dupuy HP (1978) Effect of sweet potato cultivars and pathogens on ipomeamarone content of diseased tissue. *Phytopathology* **68**, 863-865.
- Matulkova P, Gobin M, Evans M, Parkyn PC, Palmer C, Oliver I (2012) Gastro-intestinal poisoning due to consumption of daffodils mistaken for vegetables at commercial markets, Bristol, United Kingdom. *Clin Toxicol (Phila)* **50**(8), 788-90. [In eng]
- Mawhinney I, Woodger N, Trickey S, Payne J (2008) Suspected sweet potato poisoning in cattle in the UK. *Vet Rec* **162**(2), 62-3. [In eng]
- Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Beckett GA, Houck-Jankoski A, Hudson A (1994) An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* **272**(20), 1592-6. [In eng]
- Moreno AJ, Orr CD, Morales E, Weisman IM (1985) *Bacillus cereus*, diarrhea, and home-dried apples. *Ann Intern Med* **102**(6), 868-9. [In eng]
- Moret S, Smela D, Populin T, Conte LS (2005) A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry* **89**(3), 355-361.
- Mroczek A, Kapusta I, Janda B, Janiszowska W (2012) Triterpene saponin content in the roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. *J Agric Food Chem* **60**(50), 12397-402. [In eng]
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) 'Fusarium species. An illustrated manual for identification.' (Pennsylvania State University Press.: University Park, PA.)
- Nguyen-the C, Carlin F (1994) The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* **34**(4), 371-401. [In eng]
- Nielsen K, Krogh P, Moller T (1975) [Intoxication in cattle caused by a batch of sugar beet pulp (author's transl)]. *Nord Vet Med* **27**(9), 401-10. [In dan]
- Nielsen TH, Sorensen D, Tobiasen C, Andersen JB, Christophersen C, Givskov M, Sorensen J (2002) Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **68**(7), 3416-23. [In eng]
- Nielsen TH, Sorensen J (2003) Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**(2), 861-8. [In eng]
- Noah ND (1985) ABC of nutrition. Food poisoning. *Br Med J (Clin Res Ed)* **291**(6499), 879-83. [In eng]
- Noonan SC, Savage GP (1999) Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pac J Clin Nutr* **8**(1), 64-74. [In eng]
- Oshiro N, Kuniyoshi K, Nakamura A, Araki Y, Tamanaha K, Inafuku Y (2008) [A case of food poisoning due to ingestion of eggplant, *Solanum melongena*, grafted on Devil's trumpet, *Datura metel*]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **49**(5), 376-9. [In jpn]

- Peckham JC, Mitchell FE, Jones OH, Jr., Doupnik B, Jr. (1972) Atypical interstitial pneumonia in cattle fed moldy sweet potatoes. *J Am Vet Med Assoc* **160**(2), 169-72. [In eng]
- Picot L, Abdelmoula SM, Merieau A, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MGJ (2001) *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes and Infection* **3**(12), 985-995.
- Pitt, Hocking (2009) 'Contamination fongique des racines légumes.' (Fungi and food spoilage, 3e edition. Springer)
- Portnoy BL, Goepfert JM, Harmon SM (1976) An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. *Am J Epidemiol* **103**(6), 589-94. [In eng]
- Pourjafar M, Badieli K, Ghane M (2009) Spinach poisoning in a herd of deer in Shiraz animal garden, Shiraz, Iran. *Toxicology Letters* **189**, **Supplement**(0), S249.
- Ramos B, Miller FA, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM (2013) Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **20**(0), 1-15.
- Rebolledo PA, Vu CC, Carlson RD, Kraft CS, Anderson EJ, Burd EM (2014) Polymicrobial ventriculitis involving *Pseudomonas fulva*. *J Clin Microbiol* **52**(6), 2239-41. [In eng]
- Recinos DA, Sekedat MD, Hernandez A, Cohen TS, Sakhtah H, Prince AS, Price-Whelan A, Dietrich LE (2012) Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(47), 19420-5. [In eng]
- Règlement (UE) No 257/2010 (2010) Règlement (UE) No 257/2010 de la Commission du 25 mars 2010 établissant un programme pour la réévaluation des additifs alimentaires autorisés, conformément au règlement (CE) no 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil sur les additifs alimentaires.
- Rossignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley M, Orange N (2008) Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol* **8**(1), 189.
- Rudi K, Flateland SL, Hanssen JF, Bengtsson G, Nissen H (2002) Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Appl Environ Microbiol* **68**(3), 1146-56. [In eng]
- Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kampfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging AC (1999) Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl Environ Microbiol* **65**(10), 4637-45. [In eng]
- Santé Canada (2009) Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Documentation technique. Le chlore.
- Schnider-Keel U, Seematter A, *et al.* (2000) Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol* **182**(5), 1215-25. [In eng]
- Scotta C, Mulet M, Sánchez D, Gomila M, Ramírez A, Bennasar A, García-Valdés E, Holmes B, Lalucat J (2012a) Identification and genomovar assignation of clinical strains of *Pseudomonas stutzeri*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases (Internet)* **31**(9), 2133-2139. [In eng]
- Scotta C, Mulet M, Sánchez D, Gomila M, Ramírez A, Bennasar A, García-Valdés E, Holmes B, Lalucat J (2012b) 'Identification and genomovar assignation of clinical strains of *Pseudomonas stutzeri*.' (Springer: Heidelberg, ALLEMAGNE) 7

- Sheth AN, Wiersma P, *et al.* (2008) International outbreak of severe botulism with prolonged toxemia caused by commercial carrot juice. *Clin Infect Dis* **47**(10), 1245-51. [In eng]
- Siener R, Honow R, Voss S, Seidler A, Hesse A (2006) Oxalate content of cereals and cereal products. *J Agric Food Chem* **54**(8), 3008-11. [In eng]
- Smith SW, Giesbrecht E, Thompson M, Nelson LS, Hoffman RS (2008) Solanaceous steroidal glycoalkaloids and poisoning by *Solanum torvum*, the normally edible susumber berry. *Toxicon* **52**(6), 667-76. [In eng]
- Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R (2010) Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol* **3**(3), 94-9. [In eng]
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**(4), 579-606. [In eng]
- StLouis ME, Peck SHS, *et al.* (1988) BOTULISM FROM CHOPPED GARLIC - DELAYED RECOGNITION OF A MAJOR OUTBREAK. *Annals of Internal Medicine* **108**(3), 363-368.
- Tayeb LA, Lefevre M, Passet V, Diancourt L, Brisse S, Grimont PAD (2008) Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology* **159**(3), 169-177.
- Termala AM, Pohjalainen T, Hoppu K (2014) *Datura* contamination of a large batch of frozen vegetables-some poisonings and a big hassle. *Clinical Toxicology* **52**, 384-384.
- Tice R (1998)  $\alpha$ -Chaconine [20562-03-2] and  $\alpha$ -Solanine [20562-02-1]. National Institute of Environmental Health Sciences. Available online: [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem\\_Background/ExSumPdf/ChaconineSolanine.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/ChaconineSolanine.pdf) (accessed on 12 May 2014). *Review of toxicological literature*.
- Timmis KN (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**(12), 779-81. [In eng]
- Tryfinopoulou P, Drosinos EH, Nychas GJ (2001) Performance of *Pseudomonas* CFC-selective medium in the fish storage ecosystems. *J Microbiol Methods* **47**(2), 243-7. [In eng]
- Tsai HC, Lee SS, Huang CK, Yen CM, Chen ER, Liu YC (2004) Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* **71**(2), 222-6. [In eng]
- Ueno Y (1977) Trichothecenes: Overview. In 'Mycotoxins in human and animal health.' (Eds Rodricks J.V., Hesselntine C.W. and Mehlman M.A.) pp. 189-207. (Pathotox Publishers Inc: Park Forest South, IL.)
- van Velzen AG, Sips AJ, Schothorst RC, Lambers AC, Meulenbelt J (2008) The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. *Toxicol Lett* **181**(3), 177-81. [In eng]
- Wagner J, Short K, Catto-Smith AG, Cameron DJS, Bishop RF, Kirkwood CD (2008) Identification and Characterisation of *Pseudomonas* 16S Ribosomal DNA from Ileal Biopsies of Children with Crohn's Disease. *PLoS ONE* **3**(10), e3578.
- Weijters BJ, Verbunt RJ, Hoogsteen J, Visser RF (2008) Salade malade: malignant ventricular arrhythmias due to an accidental intoxication with *Aconitum napellus*. *Neth Heart J* **16**(3), 96-9. [In eng]
- Wellinghausen N, Kothe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S (2005) Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**(8), 4070-5. [In eng]

Wendel AM, Johnson DH, Sharapov U, Grant J, Archer JR, Monson T, Koschmann C, Davis JP (2009) Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin Infect Dis* **48**(8), 1079-86. [In eng]

Wilson BJ, Yang DT, Boyd MR (1970) Toxicity of mould-damaged sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). *Nature* **227**(5257), 521-2. [In eng]

Yousefi F, Shoja S, Honarvar N (2014) Empyema Caused by *Pseudomonas luteola*: A Case Report. *Jundishapur J Microbiol* **7**(7), e10923.

Zagory D (1999) Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology* **15**(3), 313-321.

Zhao NX, Ma MS, Zhang YP, Xu DC (1990) Comparative description of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme, Johannes, Cox, and Berends 1960) NCIB 9450T and strains isolated from cases of food poisoning caused by consumption of fermented corn flour in China. *Int J Syst Bacteriol* **40**(4), 452-5. [In eng]

ANNEXE

**Rapport de l'audition des experts scandinaves, suite aux épisodes de Tiac survenues en Finlande en 2010 (en anglais)**

**1. Forenote**

In 2014, several foodborne outbreaks have been notified in France in schools and retirement houses. The investigations conducted by the French Institute of Public Health Surveillance (InVS) have shown a strong association between the sudden onset of symptoms and the consumption of beetroot. In parallel to its field investigations, InVS had performed a literature review, thus identifying similar outbreaks in Finland in 2010. While outbreaks in Finland and France show consistency, both in terms of illness symptoms but also suspected food item, it seemed relevant to organize an hearing of the Finish experts involved in the local investigations at the time.

A telephone conference was set on Thursday, October 16<sup>th</sup>, 2014. The following participants from ECDC and Finland were auditioned:

- Johanna Takkinen: Head of Food- and Waterborne Diseases and Zoonosis Programme. Office of the Chief Scientist, ECDC, Sweden.
- Taina Niskanen: Expert in food and waterborne diseases. Surveillance and Response Support Unit, ECDC. Former position during 2010 outbreaks: Senior Governmental Officer, Finnish Food Safety Authority, Evira.
- Marja-Liisa Hänninen: [Department of Food Hygiene and Environmental Health](#), Faculty of veterinary medicine, University of Helsinki.
- Celine Gossner: Expert in outbreak response. Surveillance and Response Support Unit, ECDC.

In addition, a representative from InVS, the Chairman of the Biological Risk Assessment Committee, the group of nominated experts, a representative of the Chemical Risk Assessment Unit and the expertise coordinator took part to this conference.

**2. Review of outbreaks investigations and reports**

From January to November 2010, seven outbreaks in institutional canteens were reported in Finland with sudden onset of symptoms and exposure to raw beetroot. Retrospective cohort studies were performed by the regional authorities with laboratory analyses realized on outbreak food samples and also on vomitus and stool collected from some cases. The conclusion was a significant association between consumption of raw grated beetroot and illness. Symptoms include nausea, stomach ache, vomiting and diarrhea with a median time of onset around 40 minutes and a median duration of illness around 5 hours. Microbiological analyses on food item (raw beetroot samples) did not identify any common foodborne pathogens. Moulds and mycotoxins were not tested, although no visible moulds were reported from operators at different stage of the supply chain. However, analyses showed a "poor quality" of the beetroot (defined for any spoilage bacteria if total bacterial counts exceeded  $10^8$  colony-forming-units (cfu).g<sup>-1</sup>). In particular *P.fluorescens* up to  $10^9$  was found in the food samples.

Whereas the presence of *P.fluorescens* is not rare in raw vegetables, food investigations related to foodborne illness usually do not look for it but rather focus on common foodborne pathogens. During earlier investigations in 2002, in Finland, beta-hemolytic *Pseudomonas fluorescens* strain was suspected as a causative agent in a sporadic food poisoning with the onset of pinches in stomach within 10 minutes after ingestion of suspected food followed by stomach pain, diarrhea

and headache. The suspected food (commercial dessert vanilla pudding) had been cultured on bovine blood agar plates and incubated at 37°C for potential growth of *S. aureus* and *B. cereus*. Due to the upcoming weekend, the agar plates remained in the incubator, which was cooling down after the 24 hours incubation on Friday afternoon. On Monday morning, the blood agar plates were covered by dense, almost pure growth of beta-hemolytic bacteria (up to  $10^6$  cfu.g<sup>-1</sup>). The classification of the strain in the group of *Pseudomonas fluorescens* was confirmed by API NE test and 16S sequencing. Since the first isolation, an analysis for this bacterium was added to the palette of analyses for food samples related to suspected food poisonings/outbreaks in Porvoo municipal food laboratory in Finland. This bacterium was subsequently isolated in high quantities from different types of vegetable samples (e.g. mixed ready-to-eat salads) related to investigations of sporadic suspected food intoxications. The optimal temperature-time combination for culturing this bacterium on a blood agar plate is 22-25°C for 48h (no visible growth on the plates after 24 hours).

Further investigations were conducted by the Environmental Laboratory in the National Institute for Health and Welfare in 2005 in order to identify cell toxicity produced by *P.fluorescens*. Three strains from different food samples related to distinct food poisonings were tested on different cell cultures. Toxicity was comparable to the levels of toxicity from *Stachybotrys atra* (about 70% of all tested cells died), one of the most known toxic mold growing in moisture damaged buildings. In the University of Helsinki, acute toxicity was also tested on small animal models (avoidance test on rats). The results were not conclusive due to the small animal group tested. Due to the lack of resources, no further investigations were done.

Trace-back investigations of 2010 Finnish outbreaks indicated that beetroots involved in food poisonings was produced in Finland. In two outbreaks (out of 7) the beetroot variety was identified as "Pablo F1". Beetroots were peeled, before being packed in plastic bags in the processing plant. Peeled beetroots were stored between 5 to 25 days in refrigerated conditions (<6°C) before use (grating was performed in the kitchens before serving). These conditions prevent growth of pathogenic bacteria, such as *Salmonella*, but can enhance growth of psychrotrophic bacteria, such as *Pseudomonas*.

Consecutively to these outbreaks, Finnish food authorities have recommended not to eat raw red beetroot. No further outbreak has been reported since then.

### 3. Discussion

*P.fluorescens* is well known for its antibacterial and antifungal activities. It has been used in vegetable fields directly to the soil as a soil improver and plant growth promoter. So far it has always been considered "safe" from a human health point of view. The use of *P.fluorescens* does not enter in the frame of the biocide regulation.

High counts of *P.fluorescens*, up to  $10^6$  cfu.g<sup>-1</sup>, have been detected in some food matrices without any known cases with clinical symptoms being associated with the consumption of the food products. The question raised is whether the beetroot matrix (high sugar content, specific metabolism) could play a role in activating toxin-production in bacteria.

The group of *Pseudomonas* is very large and complex. It would prove interesting to deeply look into the different strains and link (e.g. genomic characteristics) with their pathogenicity.

In most outbreaks related to red beetroot the incubation period has been very short, median onset time of illness was 40 min (range <5 min to 21 h), suggesting a reaction of a body to an ingested toxic substance. In the sporadic Finnish cases from early 2002-2004, the incubation period ranged

from 10 minutes to 3 hours. The shorter incubation period could indicate higher amount of toxic compound in food and thus, symptoms could reflect the dose-effect relationship.

For further food analyses, the use of conventional blood agar plates with incubation conditions of 22-25 degrees for 48 hours is highly recommended. Sufficient number of dilutions is necessary to detect high bacterial counts ( $10^6$ ).

According to the Finnish experts, this bacterium has been the only finding in several other food samples that have been investigated due to suspected sporadic food intoxications with short incubation period (for instance salads used for hamburgers and mixed ready-to-eat salads). As expected, analyses targeted to traditional foodborne pathogens were negative although in many food samples from 2010 outbreaks the hygienic quality was poor based on total colony counts.

The revealed presence of *P.fluorescens* in high counts in beetroot samples is foreseen as highly suspicious causative agent for the foodborne outbreaks but further investigation is needed to describe mechanisms that could explain the role of raw beetroots in causing gastrointestinal symptoms.