

Maisons-Alfort, le 25 juin 2003

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la révision de l'arrêté ministériel du 21/12/1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 22 janvier 2003 par Direction générale de l'alimentation, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et par la Direction générale de la santé d'une demande d'avis portant sur la révision des critères microbiologiques réglementaires s'appliquant aux denrées alimentaires.

Cette demande d'avis s'inscrit dans le cadre de la réflexion nationale sur la révision de l'arrêté ministériel du 21 décembre 1979 et de la refonte de la législation communautaire relative à l'hygiène des aliments et au contrôle des zoonoses. Au plan national, les groupes de travail¹, mis en place conjointement par les administrations et l'Afssa pour mener cette réflexion, et associant les filières professionnelles concernées, ont procédé à l'examen des microorganismes pathogènes d'intérêt. Par la suite, le groupe « Pathogènes » a identifié, parmi ceux-ci, un certain nombre de microorganismes pour lesquels une expertise scientifique complémentaire s'avérait nécessaire, compte tenu de l'évolution des connaissances. Il s'agit de : *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Bacillus cereus*.

Pour ce qui concerne les microorganismes indicateurs d'hygiène, ils font l'objet d'un examen spécifique qui est conduit dans le cadre des groupes de travail propres à chaque filière et ne sont pas pris en compte dans cet avis.

L'expertise relative aux microorganismes pathogènes, seuls concernés par cet avis, est structurée autour de questions² formulées dans la saisine, et a fait l'objet d'une validation par le Comité d'Experts Spécialisé « Microbiologie »³, réuni le 22 avril 2003. Le Comité « Microbiologie » émet l'avis suivant :

¹ Groupes : "Généraliste", "Pathogènes", "Echantillonnage", "Méthodes d'analyses", "Viandes et produits carnés", "Lait et produits laitiers", "Produits de la pêche et coquillages"

² Les questions de la saisine adressée à l'Afssa figurent en encadré dans le corps du texte

³ L'expertise scientifique validée par le CES « Microbiologie » figure en *italique* dans le corps du texte. Les chapitres figurant en police "standard" correspondent à une expertise interne à l'Afssa qui a bénéficié d'une relecture critique par des experts de l'Afssa.

EXPERTISE PAR MICROORGANISME PATHOGENESALMONELLA SP.

- | |
|---|
| <p>I. Est-il possible de définir une relation dose-réponse, sinon est-il possible de préciser la virulence des souches considérées comme pathogènes ?</p> |
|---|

Considérant le pouvoir pathogène des salmonelles,

Les salmonelles non typhiques sont l'une des principales causes bactériennes des syndromes gastro-entériques dans les pays industrialisés. Le tableau clinique associe habituellement une fièvre à 39°C - 40°C, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et un syndrome diarrhéique fait de selles liquides et fétides. L'évolution est le plus souvent spontanément favorable en 3 à 5 jours mais, chez le sujet fragilisé (jeune enfant, sujet âgé, affaibli ou immunodéprimé), il peut apparaître une déshydratation avec insuffisance rénale. De plus, le caractère invasif de certaines de ces bactéries peut entraîner la possibilité de bactériémies avec des localisations secondaires. D'autre part, il est également établi que certaines infections peuvent être totalement asymptomatiques et être ainsi la source d'un portage chronique.

Certains sérovars ont développé une spécificité d'hôte particulière, comme *S. Gallinarum* pour la volaille, *S. Dublin* pour les bovins, *S. Abortus-ovis* pour les ovins et *S. Cholerae-suis* pour le porc, se traduisant par des pathologies déterminées. Par contre, les animaux infectés par d'autres sérovars non-adaptés, peuvent devenir porteurs asymptomatiques, exprimant parfois des signes cliniques modérés. Actuellement, les infections sont principalement dues à la première sous-espèce du genre *Salmonella* : *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, les sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium* étant très fréquemment isolés ; ils représentent environ 20% des souches isolées d'origine non humaine mais il existe plus de 2400 sérovars actuellement décrits.

L'ensemble des sérovars doit être considéré comme potentiellement pathogène pour l'homme, pouvant déclencher des infections gastro-intestinales de sévérités variables. Ainsi, même les sérovars adaptés à un hôte qui, jusqu'à présent, étaient considérés comme non pathogènes pour l'homme, ne doivent plus échapper à cette règle, comme par exemple *S. Dublin* (SCVPH, 2003).

Considérant la virulence des souches de *Salmonella* sp.,

Les différents aspects des mécanismes d'expression de la virulence des salmonelles ne sont pas totalement élucidés, mais il est certain que des gènes plasmidiques et chromosomiques y sont impliqués. Des îlots de pathogénicité ainsi qu'un certain nombre de gènes de virulence ont été décrits. Le plasmide de virulence n'est présent que parmi les salmonelles non typhiques avec une structure variable selon les sérovars.

Après ingestion, la bactérie adhère aux cellules épithéliales de l'ileum grâce aux systèmes de fimbriae, puis pénètre dans ces cellules pour y produire des entérotoxines et des cytotoxines. La multiplication bactérienne se déroule dans le tissu lymphoïde, mais à un degré dépendant notamment de la virulence de la souche et de l'aptitude génétique de l'hôte (Zhang-Barber et al., 1999). L'antigène Vi ne peut s'exprimer que parmi les souches de sérovars Typhi, Paratyphi C et Dublin ; il confère une grande résistance à l'activité bactéricide du sérum et participe à une inhibition de l'activation du complément par la voie alterne. Les données du rapport FAO/WHO mentionnent qu'il n'y a pas de différence de comportement entre le sérovar *Enteritidis* et les autres sérovars sur le développement de l'infection.

Considérant la dose infectieuse,

Dans une population ne présentant pas de déficience immunitaire particulière, la dose infectieuse pourra varier en fonction de la souche bactérienne ingérée. Ainsi, pour les sérovars de *Salmonella* spp. ne présentant pas d'adaptations particulières à un hôte animal, des études expérimentales font état de la nécessité d'ingérer des quantités atteignant 10^5 à 10^7 bactéries afin d'initier l'expression clinique de la maladie (Mc Cullough et Eisele, 1951) ; cependant des données obtenues lors d'enquêtes consécutives à la survenue de toxico-infections alimentaires, indiquent que les infections peuvent se déclarer entre 10^1 et 10^{11} cellules (D'Aoust et al., 1985 ; Lehmacher et al., 1995). Il a également été noté que cette dose infectieuse est plus basse lorsque les salmonelles sont apportées dans des aliments à haute teneur en matière grasse ou en protéines, substances qui entraîneraient une protection des bactéries contre l'acidité gastrique (D'Aoust et al., 1975 ; Blaser et Newman, 1982).

Il existe un modèle de courbe dose-réponse présenté dans le document FAO/WHO, construit à partir des données observées relatives aux foyers épidémiques dans différents pays. En ce qui concerne le cas particulier de *Salmonella* Enteritidis dans les œufs, il a été montré dans ce même rapport que la probabilité d'être infecté ne dépend pas du nombre de bactéries dans les œufs contaminés, mais serait liée au fait que l'effet de la croissance de *S. Enteritidis* est plus grand que l'effet de la dose initiale. Cela pourrait être dû à ce que l'effet de la croissance de *Salmonella* serait plus grand que celui du niveau initial de contamination des œufs, dans les conditions de stockage prises en considération dans le modèle étudié.

II. Est-il possible de préciser, pour chaque sérotype (ou catégorie de sérotypes) identifié comme pathogène, les valeurs des principaux paramètres ou combinaisons de paramètres et les conditions de préparation et de conservation du produit (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation, etc..) ayant une incidence sur l'évolution (inhibition de croissance ou destruction) de ce microorganisme ?

Si non, est-il possible de définir les valeurs des principaux paramètres ou combinaison de paramètres et les traitements associés (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation, etc..) permettant d'inhiber et de détruire l'ensemble des sérotypes identifiés comme pathogènes ?

Considérant la vie et la survie des *Salmonella* dans l'environnement,

Des souches de *Salmonella* sp. ont été isolées dans des environnements très variés. Elles sont capables de se multiplier dans des conditions aérobies ou anaérobies, dans une gamme de températures très large (5°C - 46°C) avec un optimum de croissance se situant entre 35°C et 43°C .

Les valeurs de pH supérieures à 9 ou inférieures à 4 sont considérées comme bactéricides vis-à-vis des souches de *Salmonella* sp.

La croissance des salmonelles est inhibée lorsque l'activité de l'eau (a_w) est inférieure à 0,94.

Ces données sont générales et, à partir de ce constat, de nombreuses études ont été réalisées pour évaluer le comportement de différentes souches de *Salmonella* sp. dans certaines matrices alimentaires.

Considérant les principaux paramètres techniques ayant une incidence sur la croissance et la survie des salmonelles,

Considérant tout d'abord que tous les sérovars doivent être considérés comme potentiellement pathogènes, il n'y a pas lieu de préciser les données pour chacun d'entre eux ; que, cependant, la majorité des études présentées ici ont été effectuées avec des souches de serovar Typhimurium ou Enteritidis ;

Considérant qu'il est difficile dans le contexte de ces études de différencier un effet bactériostatique d'un effet bactéricide ;

Considérant également que l'approche unifactorielle permettant de définir des valeurs extrêmes et optimales des principaux paramètres susceptibles d'inhiber ou de détruire les microorganismes est de moins en moins abordée, au profit d'une approche multifactorielle dans un esprit de "microbiologie prévisionnelle" ;

Considérant enfin que, d'après les travaux de Sherry et al. (2002), la résistance à différents paramètres physico-chimiques est variable selon les sérovars (33 sérovars testés), et qu'il existe également une variabilité de réponse en fonction de la souche pour un sérovar donné (*S. Typhimurium*) ;

1. La température

1.1. Le traitement par la chaleur

Il est reconnu que les traitements thermiques ont un effet bactéricide et ils sont donc utilisés pour la préservation des aliments. La réponse bactérienne à un traitement thermique peut être évaluée quantitativement au moyen de la valeur de réduction décimale (D), exprimé en minutes à une température donnée, nécessaire pour réaliser une réduction de 90 % du nombre de bactéries viables concernées. Ce calcul permet de mettre en évidence des différences de sensibilité non seulement entre des souches appartenant à la même espèce bactérienne, mais également pour une même souche en fonction de paramètres environnementaux tels l'humidité, le pH, etc ... (Jay, 1992). Ainsi, *Salmonella* Senftenberg 775W est reconnue comme ayant une thermorésistance supérieure à d'autres souches de *Salmonella* sp., par exemple 30 fois plus élevée que *S. Typhimurium* (Ng et al., 1995), cette résistance se manifestant quelles que soient les autres conditions environnementales (Tableau 1).

Tableau 1. Effets de l'activité de l'eau (a_w) et de la température (en degrés Celsius) sur la résistance à la chaleur de *S. Typhimurium* et *S. Senftenberg* (ICMSF, 1996).

a_w	valeur D (min)					
	<i>S. Senftenberg</i>			<i>S. Typhimurium</i>		
	60°C	65,5°C	70°C	60°C	65,5°C	70°C
0,995	7,2	1,1	0,2	0,18	0,05	<0,05
0,98	7,2	1,1	0,2	0,60	0,066	<0,05
0,94	14,5	3,6	0,5	4,3	0,83	0,3
0,90	11,4	3,8	1,0	4,8	2,66	0,6
0,85	-	4,1	1,1	10	3,53	1,4

- : Pas de données

1.2. Le traitement par le froid

La réfrigération :

La croissance est sensiblement ralentie lorsque les températures sont inférieures à 15°C (Tableau 2) Ainsi, à 8°C les temps de doublement se situent entre 22 et 35 heures (Broughall et al., 1983 ; Grau, 1987 ; Gibson et al., 1988). Les températures les plus basses permettant la croissance sont de 5,2°C dans un milieu synthétique de laboratoire (Matches et Liston, 1972) et 6,7°C dans un produit alimentaire (Angelotti et al., 1961). Bien que la température la plus basse à laquelle une croissance est décelée soit de 5°C, la plupart des sérovars ne se développent pas en dessous de 7°C (ICMSF, 1996).

Tableau 2. Effet de la température sur la croissance de *Salmonella* sp. dans de la viande hachée de bœuf (pH 5,4 – 5,7) (ICMSF, 1996).

Température (°C)	Temps de doublement (H)	
	a	b
35	0,47	0,43
30	0,65	0,56
25	1,11	0,97
20	1,59	1,43
15	3,03	3,03
10	15,15	10,00

a= Ratio d'inoculation élevé : 10^4 salmonelles et 10^4 bactéries viables /gramme.

b= Faible ratio d'inoculation : 40 salmonelles et 10^6 bactéries viables /gramme.

Ainsi, à moins que la température ne soit maintenue en dessous de 7°C, les salmonelles peuvent se multiplier dans beaucoup de produits alimentaires. De plus, il est important de noter que les salmonelles sont capables de survivre pendant de longues périodes dans des matrices alimentaires.

La congélation :

Cette opération a pour objectif d'abaisser la température du produit en dessous de 0°C et plus particulièrement en dessous de -18°C.

Lors de ce traitement et du stockage à ces températures négatives, certaines propriétés des bactéries peuvent être altérées ; cependant, bien que les salmonelles et les autres bactéries à coloration de Gram négatif soient considérées comme les plus sensibles à ce processus d'altération, le taux de destruction demeure relativement faible (Rosset, 1982) et ce procédé ne peut en aucune manière être considéré comme un traitement assainissant.

2. La teneur en eau

La croissance bactérienne nécessite la présence d'eau dans le milieu environnant. Il est généralement admis que cette quantité en eau disponible, définie comme l'activité de l'eau (a_w), conditionne l'aptitude ou non d'un microorganisme à se développer. L'absence d'eau dans une matrice alimentaire est donc un moyen technologique pouvant être utilisé pour limiter ou inhiber cette croissance.

Selon D'Aoust (1997), la croissance de *Salmonella* sp. est inhibée lorsque cette valeur d' a_w est inférieure à 0,93. Pour atteindre cette valeur, ou des valeurs inférieures, il convient donc de limiter la quantité d'eau disponible dans le produit alimentaire, par exemple par un séchage ou un salage. Néanmoins, si la croissance est inhibée, les salmonelles peuvent survivre dans ces conditions de traitement et certains sérovars sont fréquemment retrouvés dans des produits deshydratés (S. Cerro, S. Anatum ...).

Le procédé de séchage permet de diminuer la quantité d'eau et d'atteindre une a_w comprise soit entre 0,0 et 0,60 pour des denrées desséchées ou à basse teneur en eau, soit entre 0,60 et 0,85 pour celles à teneur intermédiaire en eau (Jay, 1992).

Le salage, ou la salaison, des aliments sont également des un moyens de conservation des denrées alimentaires par un léger effet bactéricide du sel utilisé sur certains microorganismes et surtout par un abaissement de la quantité d'eau libre dans la matrice alimentaire, entraînant une diminution de l'activité de l'eau (a_w) et un arrêt de la croissance bactérienne. Suivant le degré de salage, les produits peuvent être conservés soit à température ambiante, soit en réfrigération.

3. L'acidification

L'utilisation d'acides organiques permet en particulier d'abaisser le pH du substrat et d'inhiber ainsi la croissance bactérienne voire de détruire les cellules bactériennes (Jay, 1992). De nombreuses expérimentations ont été menées afin de connaître l'efficacité de certains de ces acides, tels l'acide lactique, l'acide citrique ... Ainsi, l'effet de l'acide acétique dans des vinaigrettes permet d'inhiber respectivement *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* en 5 à 10 minutes après inoculation de 5.10^6 bactéries (Miller et Martin, 1990).

Dans certains pays et sous certaines conditions, des acides organiques peuvent être utilisés sur des carcasses d'animaux après abattage pour réduire la contamination bactérienne superficielle. Les produits les plus utilisés correspondent aux acides lactique et acétique, seuls ou en association et permettent une réduction de 10 à 1000 fois, de la contamination initiale, y compris des salmonelles. Ces procédés, bien qu'efficaces, ne sont pas autorisés dans l'Union Européenne.

4. Autres traitements chimiques

D'autres substances permettant des modifications chimiques peuvent être utilisées. Ainsi le trisodium phosphate (TSP) a été approuvé aux USA pour le traitement des carcasses de volailles et de bovins dans l'objectif de réduire certains microorganismes pathogènes dont les salmonelles. Ce procédé, basé sur un pH alcalin élevé (10-12), permet un détachement des bactéries et une lyse des enveloppes cellulaires, particulièrement celles des bactéries à coloration de Gram négatif (Giese, 1993).

Le chlore et ses composés tels le dioxyde de chlore, sont également des substances ayant une activité bactéricide reconnue.

5. Les traitements ionisants

L'efficacité du procédé utilisant des radiations ionisantes dépend de différents facteurs intrinsèques tels que la résistance et le stade physiologique des bactéries concernées, et extrinsèques tels que la température, la présence d'oxygène et l'humidité du produit (Farkas, 1996). Concernant *Salmonella* sp., Farkas (1996) rapporte que des valeurs de 0,18 à 0,92 kGy d'une part et de 0,37 à 1,28 kGy d'autre part sont nécessaires pour réduire d'une puissance logarithmique des contaminations de viandes et de volailles respectivement fraîches et congelées. Ces valeurs sont bien en deçà de la valeur de 10 kGy reconnue comme le seuil tolérable d'un point de vue toxicologique (FAO/IAEA/WHO, 1981). En conséquence, des traitements à des doses variant entre 1,5 et 3 kGy ont parfois été recommandés pour abaisser le niveau de contamination de certains produits par des formes végétatives et plus particulièrement par les salmonelles.

6. Les hautes pressions

L'utilisation de nouvelles technologies basées sur l'application de hautes pressions sur les denrées alimentaires, constitue un réel progrès pour la qualité microbiologique de ces dernières, sans altération des qualités organoleptiques (Yuste et al., 2002). L'efficacité de ces traitements vis-à-vis de plusieurs microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme et notamment plusieurs sérovars de *Salmonella* sp., a été clairement démontrée (Patterson et al., 1995) et leur application est effective pour certains produits. Cependant ces traitements demeurent encore "confidentiels" du fait des coûts encore élevés, de la résistance des spores bactériennes ainsi que de la réglementation en vigueur relative aux nouveaux aliments (Doussin, 2001).

Bibliographie - Section *Salmonella* sp.

- Anonyme. 1981. Rapport FAO/IAEA/WHO
- Blaser MJ, Newman LS. 1982. A review of human salmonellosis. I. Infective dose. Rev Infect Dis ; 4:1096-1106.
- Broughall JM, Anslow PA, Kilsby DC. 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods : development of mathematical models describing the effect of water activity. J Appl Bacteriol ; 55(1):101-10
- D'Aoust JY, Aris BJ, Thisdele P, Durante A, Brisson N, Dragon D, Lachapelle G, Johnston M, Laidley R. 1975. *Salmonella* Eastbourne outbreak associated with chocolate. Can Inst Food Sci Technol J ; 8:181-184.
- D'Aoust JY, Warburton DW, Sewell AM. 1985. *Salmonella* Typhimurium phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian Foodborne outbreaks. J Food Prot ; 48:1062-1066.
- D'Aoust JY. 1997. *Salmonella* species. In : "Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers", Doyle, Beuchat and Montville ; éditions, American Society for Microbiology, Washington D.C., 129-158.
- Doussin JP. 2001. Aspects réglementaires. In : "Traitements ionisants et hautes pressions des aliments", M. Federighi et J.L. Tholozan ; éditions, Economica, Paris, 229-256.
- FAO/WHO. 2002. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Microbiological Risk assessment Series 1.
- Farkas J. 1996. Status and prospects of decontamination and preservation of poultry meat/carcasses by ionising radiation. In : "Status and prospects of decontamination and preservation of poultry and egg products", P. Colin and R.W.A.W. Mulder; éditions, Ploufragan, 75-82.
- Gibson AM, Bratchell N, Roberts TA. 1988. Predicting microbial growth : growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int J Food Microbiol ; 6:155-178.
- Giese J. 1993. *Salmonella* Reduction Process receives approval. Food Technology ; 47:110.
- Grau FH. 1987. Prevention of microbial contamination in the export abattoir. In : "Elimination of pathogen organisms from meat and poultry", F.J.M. Smulders ; éditions, Elsevier, Amsterdam, 221-233.
- ICMSF. 1996. Microorganisms in Foods. 5 : Characteristics of Microbiological Pathogens. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Blackie Academic and Professional, London.
- Jay JM. 1992. Modern Food Microbiology, Chapman and Hall, London.
- Lehmacher A, Bockemühl J, Aleksis J. 1995. A nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. J Infect Dis ; 115:501-511.
- Mac Cullough NB, Eisele CW. 1951. Experimental human salmonellosis. 1. Pathogenicity of strains of *Salmonella* Meleagridis and *Salmonella* Anatum obtained from spray-dried whole egg. J Infect Dis ; 88:278-289.
- Matches JR, Liston J. 1972. Low temperature growth of *Salmonella*. J Milk Food Technol ; 35:49-52.
- Miller ML, Martin ED. 1990. Fate of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium into an Italian salad dressing with added eggs. Dairy Food Environment Sanit ; 10(1):12-14.
- Ng H, Bayne HG, Garibaldi JA. 1969. Heat resistance of *Salmonella* : the uniqueness of *Salmonella* Senftenberg 775W. Appl Microbiol ; 17(1):78-82.
- Patterson MF, Quinn M, Simpson R, Gilmour A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. J Food Prot ; 58(5):524-529.
- Rosset R. 1982. Chilling, freezing and thawing. In : "Meat microbiology", Applied Science Pub., London, 265-278.
- SCVPH. 2003. Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Opinion on " *Salmonellae* in Foodstuffs" (<http://europa.eu.int/com/food/fs/sc/scv/outcome>).
- Sherry AE, Patterson MF, Madden RH. 2002. Resistance of *Salmonella* serovars to injury induced by irradiation, thermal stress and high pressure. Proceedings "Salmonella and salmonellosis" Symposium, Saint-Brieuc (F.), 29-31 May, 635-636.
- Yuste J, Pla R, Capellas M, Mor-Mur M. 2002. Application of high-pressure and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. Food Control ; 13:451-455.
- Zang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. 1999. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine ; 17:2538-2545.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS**I. Peut-on définir une relation dose/effet pour les entérotoxines produites par *S. aureus* ?**

L'apparition de symptômes chez un individu dépend de la quantité d'entérotoxine ingérée, et de sa sensibilité aux toxines. Les estimations varient de moins de 1 ng à près de 500 ng par kilo de masse corporelle (Sutra, 1998).

L'ingestion de 20-100 ng d'entérotoxines constituerait la dose minimale capable de provoquer des troubles chez les individus les plus sensibles, d'après l'étude de deux foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) survenus, l'un en 1985 aux USA (Evenson et al., 1988), l'autre en 2000 au Japon (Asao et al., 2003) et mettant en cause l'entérotoxine A. Il est à noter une grande variabilité de sensibilité d'un individu à l'autre.

II. Est-ce que toutes les toxines identifiées à ce jour présentent un risque équivalent pour la santé publique ?

Plusieurs types immunologiques d'entérotoxines ont été décrits : les types A à E détectables par des méthodes immunologiques commercialisées, d'incidences connues, et les types G à O récemment décrits, d'incidences inconnues. Le type A, seul ou en association avec d'autres types, est le plus fréquemment impliqué dans les toxi-infections alimentaires collectives (Sutra, 1998). Aucun élément publié à ce jour ne permet de dire que les entérotoxines présenteraient un danger différent pour la santé publique.

III. Quelle est la relation entre la concentration en *S. aureus* et la quantité d'entérotoxines ?

*Les entérotoxines sont généralement détectables dans une population de *S. aureus* enterotoxinogènes après une multiplication importante de l'agent pathogène et des densités terminales supérieures à 10⁶ cellules bactériennes par gramme. Cependant, il n'y a pas systématiquement de corrélation entre le nombre de *S. aureus* retrouvé dans un aliment et la présence ou l'absence d'entérotoxines. On peut avoir le cas d'une multiplication importante sans production de toxines, lorsque les souches présentes ne sont pas toxigènes ou que les conditions sont favorables à la croissance mais pas à la toxinogénèse. Inversement, on peut avoir le cas où on ne dénombre qu'un faible nombre de staphylocoques ou aucun staphylocoque alors que les entérotoxines sont présentes, lorsque l'aliment a été le siège d'une multiplication importante avec production d'entérotoxines et qu'un traitement ultérieur (chaleur, acidification, ...) a inactivé les bactéries mais pas les entérotoxines, ces dernières étant plus stables que les staphylocoques (De Buysse, 1996 ; Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : Staphylococcus aureus", 2003).*

IV. Y a-t-il une concentration de cellules au-dessous de laquelle il n'y a pas de production de toxines ayant un effet sur la santé publique ?

La production de toxines est liée à une multiplication importante de cellules bactériennes mais aussi au pouvoir toxigène de ces cellules. Plus de 50% des souches isolées d'aliments sont capables de produire une ou plusieurs entérotoxines en culture mais à des niveaux de concentration très divers selon les souches. Dans ces conditions, il est difficile de définir une concentration de cellules en dessous de laquelle il n'y a pas de production d'entérotoxines. Le niveau de 10⁵ cellules par gramme a été proposé dans certains "guidelines" (Asperger, 1994 ; Sutra, 1998). Cependant, les entérotoxines n'ont pas été

détectées avant que le nombre de *S. aureus* n'atteigne un niveau de 10^6 par gramme, d'après les diverses études réalisées avec différentes matrices alimentaires et différentes souches (Genigeogis, 1989 ; Asperger, 1994 ; Meyrand et al., 1998). En se basant sur les données publiées, les experts estiment qu'une densité supérieure ou égale à 10^6 cellules toxigènes de *S. aureus* par gramme d'aliment est nécessaire pour obtenir une quantité d'entérotoxines susceptible d'induire une toxi-infection alimentaire.

V. Quelles sont les conditions physico-chimiques permettant la production des entérotoxines par *Staphylococcus aureus* et/ou la multiplication de ce germe ?

Ces conditions physico-chimiques sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Conditions physico-chimiques permettant la production des entérotoxines par *S. aureus* et/ou la multiplication de ce microorganisme (De Buyser, 1996 ; les données de Schmitt et al., 1990, déterminées pour une période de 7 jours, sont entre parenthèses) :

Facteur	Croissance	Production d'entérotoxines
Température	6-46°C (6,5-48,5)	10-45°C (14-45,5)
Température optimale	37°C (35-41)	40°C
pH	4-9,8	5-8
pH optimum	6-7	6,5-7 (stable)
NaCl	0-20%	0-10%
NaCl optimum	0%	0%
Aw	0,83->0,99	0,86->0,99
Aw optimum	>0,99	>0,99

VI. Est-il possible de préciser les valeurs des principaux paramètres ou combinaisons de paramètres et les traitements associés (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation, etc...) permettant soit d'inhiber la multiplication de *S. aureus* ou la production d'entérotoxines, soit de les détruire ?

Staphylococcus aureus est une bactérie thermosensible : une exposition à une température de 60°C pendant 0,43 à 8 min permet de détruire 90% des cellules bactériennes. Une réduction partielle du nombre de bactéries dans la viande hachée a été observée après 8 jours de stockage à - 20°C. Un traitement de 0,1 à 0,6 kgray permet de détruire 90% des cellules.

Les entérotoxines sont thermostables ou partiellement dénaturées à la chaleur. Elles ne sont pas détruites par la pasteurisation du lait.

La thermorésistance des toxines est fonction du sérovar (l'entérotoxine C est plus thermostable que l'entérotoxine B, elle-même plus thermostable que l'entérotoxine A), et de nombreux autres paramètres dont la nature du milieu, la concentration et le degré de pureté des entérotoxines. Les entérotoxines A, B, C (100 ng/ml) n'ont été complètement inactivées qu'après 20 à 40 min à 120°C selon une étude réalisée avec du tampon phosphate. Dans une autre étude, les entérotoxines A et D à la concentration de 50 ng/ml ajoutées dans du lait ont été inactivées respectivement à 96 et 92 % après un traitement UHT (143°C – 9 secondes). Plus récemment, de l'entérotoxine A (58 ng/g) formée dans des champignons artificiellement contaminés par une souche toxigène, a conservé en partie ses activités biologiques et sérologiques après appertisation en boîte pendant 28 min à 121°C et 15 min à 120°C. La dénaturation des entérotoxines pourrait être réversible. Elles sont résistantes aux

rayonnements ionisants et à la congélation (Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : Staphylococcus aureus", 2003).

En cas de contamination à un niveau faible par S. aureus, le maintien de l'aliment à une température inférieure à 6°C permet d'éviter la multiplication bactérienne et la toxinogénèse. Certaines flores associées peuvent aussi inhiber la multiplication et/ou la toxinogénèse du microorganisme par acidification du milieu (De Buyser, 1996).

VII a. Quelles sont les méthodes de détection et/ou de quantification des entérotoxines, ainsi que leurs caractéristiques, intérêts, limites et contraintes pour leur mise en œuvre, en fonction des catégories de matrices alimentaires ?

Les méthodes de détection des entérotoxines disponibles actuellement sont des méthodes immunologiques utilisant des anticorps anti-entérotoxines A, B, C, D, E.

Il s'agit de kits commercialisés basés sur des méthodes immuno-enzymatiques ou sur l'agglutination passive reverse de latex sensibilisé. Ces méthodes doivent pouvoir détecter au moins 0,1 ng d'entérotoxines par g d'aliment (soit 0,5 ng/ml d'extrait).

Les contraintes sont l'extraction des entérotoxines de l'aliment car le protocole est de complexité variable selon la matrice concernée.

Les limites de cette méthode sont des difficultés d'interprétation des résultats liées à :

- la perte éventuelle des entérotoxines en cours d'extraction ou une répartition inégale des toxines dans l'échantillon ou la présence d'entérotoxines non détectables par le kit, ce qui peut donner des résultats faux négatifs
- des interférences liées à la matrice entraînant des résultats faux-positifs.

Les méthodes commercialisées sont semi-quantitatives. La méthode de confirmation utilisée par le Laboratoire Communautaire de Référence pour le lait et les produits laitiers est une méthode ELISA quantitative (Lapeyre et al., 1988; Macaluso et Lapeyre, 2000) mais elle n'est pas commercialisée.

VII b. Cette recherche d'entérotoxines en première intention est-elle réalisable en pratique ?

La recherche d'entérotoxines n'est pas réalisable en première intention. Il n'existe pas de méthode validée AFNOR tous produits. Il existe une méthode de référence européenne validée par le Laboratoire Communautaire de Référence pour le lait et les produits laitiers (Lapeyre et al., 1996 ; Hennekinne et al., 2003). Même pour ce type de produit, la recherche des entérotoxines n'est pas réalisée en première intention mais seulement en cas de dépassement du critère microbiologique M relatif à S. aureus en autocontrôle, en raison des difficultés analytiques et d'interprétation des résultats mentionnées ci-dessus et du coût de l'analyse (Macaluso et Lapeyre, 2000).

VII c. Dans quel cadre peut-on envisager en routine de remplacer la recherche du germe par celle des toxines éventuellement présentes ?

Il est envisageable de remplacer, en routine, la recherche du microorganisme par celle des entérotoxines dans le cadre d'analyse de produits pour lesquels le dénombrement des staphylocoques, quel que soit le résultat, ne permet pas de tirer des conclusions quant à la présence éventuelle d'entérotoxines. Mais là encore, il faut tenir compte des difficultés analytiques et d'interprétation des résultats rencontrées en l'état actuel des méthodes, lesquelles ne permettent pas une détection fiable des entérotoxines.

Bibliographie - Section *Staphylococcus aureus*.

- Afssa. Fiche de description d'un danger microbiologique : *Staphylococcus aureus*, Responsable ML. De Buyser ; à paraître sur le site www.afssa.fr.
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakasawa H, Kosaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan : estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered milk. *Epidemiol Infect* ; 130:13-40.
- Asperger H. 1994. *Staphylococcus aureus*. In : "The significance of pathogenic microorganisms in raw milk". Monographie, document n°9405 ; G. Hahn ; Editions Fédération internationale de laiterie, Bruxelles, 24-42.
- De Buyser ML. 1996. Les staphylocoques. In : "Microbiologie alimentaire" Tome 1 : Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité des aliments ». CM. Bourgeois, JF. Mesclé et J. Zucca ; éditions Tec&Doc Lavoisier. 11 rue Lavoisier 75384 Paris, 105-119.
- Evenson ML, Hinds MW, Berstein RS, Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol* ; 7:311-316.
- Genigeorgis CA. 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int J Food Microb* ; 9:327-360.
- Hennekinne J-A, Gohier M, Maire T, Lapeyre C, Lombard B, Dragacci S. 2003. First proficiency testing to evaluate the ability of National Reference Laboratories of the European Union to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *J AOAC Int* ; 86(2):332-339.
- Lapeyre C, Janin F, Kaveri SV. 1988. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C1 and D in food samples. *Food Microbiol* ; 5:25-31.
- Lapeyre C, de Solan MN, Drouet X. 1996. Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins : international interlaboratory study. *J AOAC Int* ; 79(5):1095-1101.
- Macaluso L, Lapeyre C. 2000. Characterisation of the staphylococcal enterotoxin research method in a dairy product. *Analysis* ; 28(7):610-615.
- Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Vernozy-Rozand C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of camembert-type cheeses from raw goats'milk. *J Appl Microb* ; 85:537-544.
- Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmid-Lorenz W. 1990. Temperature limits of growth, Tnase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol* ; 11:1-20.
- Sutra L. 1998. *Staphylococcus aureus*. In : « Manuel de bactériologie alimentaire », L. Sutra, M. Federighi, JL. Jouve. Editions polytechnica. 15 rue Lacépède, 75005 Paris, 52-80.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

- I. Quels sont les facteurs de pathogénicité de *Clostridium perfringens* ? Quels sont les rôles respectifs des spores, des cellules végétatives et des toxines produites éventuellement dans l'aliment dans l'expression de cette pathogénicité ?

Clostridium perfringens est l'espèce bactérienne qui produit le plus grand nombre de toxines et d'enzymes. On distingue des toxines dites majeures (toxines alpha, bêta, epsilon et iota) qui sont létales pour la souris et des toxines mineures (dont l'activité est plus faible). *C. perfringens* est divisé en 5 toxinotypes d'après les toxines majeures produites (Tableau 4). Les toxines dites mineures ne font pas partie des toxines utilisées pour définir le toxinotype de *C. perfringens* et comprennent notamment les toxines delta (δ) et téta (θ), qui sont des hémolysines. Chaque type de *C. perfringens* peut par ailleurs produire l'entérotoxine qui est impliquée dans les toxi-infections alimentaires.

Tableau 4. Les toxinotypes de *Clostridium perfringens*

Toxinotype	Toxines majeures			
	Alpha (α)	Bêta (β)	Epsilon (ϵ)	Iota (ι)
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++ principale toxine produite,
 + toxine secondaire produite en générale en moindre quantité,
 - toxine non produite

C. perfringens est responsable de deux formes très différentes de toxi-infections alimentaires chez l'homme : une forme légère, produite par le type A entérotoxino-gène et une forme sévère, devenue rarissime, connue sous le nom d'entérocolite nécrosante, et causée par le type C.

Considérant les toxi-infections alimentaires à *C. perfringens* de type A,

Cette toxi-infection est principalement due à l'ingestion de *C. perfringens* suivie par la synthèse d'entérotoxines par cette bactérie au sein du tube digestif. Cette hypothèse est confirmée d'une part par le fait que l'entérotoxine est thermolabile à partir de 55°C et sensible aux acides et aux enzymes protéolytiques ; d'autre part, par les données épidémiologiques : c'est seulement en quelques rares occasions qu'une toxine pré-formée a pu être en cause au cours d'une toxi-infection avec une période d'incubation beaucoup plus courte que la normale. Il apparaît donc que c'est à la suite de l'ingestion d'aliments contaminés que les bactéries sont dans des conditions favorables pour sporuler dans la partie distale du tube digestif (iléon) et produire l'entérotoxine en grandes quantités. La concentration en entérotoxine est quelquefois si élevée dans les cellules que l'on peut observer des inclusions cristallisées dans le cytoplasme au cours de la sporulation. L'entérotoxine est libérée dans le contenu intestinal par éclatement du sporange lors de la libération des spores. L'entérotoxine libre est modifiée par protéolyse et son activité augmente d'environ trois fois. L'entérotoxine est constituée par 320 acides aminés pour un poids moléculaire de 35 kDa. Elle semble posséder au moins deux domaines d'activité distincts : l'extrémité N-terminale est responsable de la cytotoxicité, l'extrémité C-terminale

responsable de sa fixation sur un récepteur. L'entérotoxine se fixe sur un récepteur de nature protéique de 50 kDa, localisé sur la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle et du côlon. On observe alors l'intégration de la molécule d'entérotoxine dans la membrane (il n'y a pas d'internalisation dans le cytosol) et la formation d'un complexe de 110 kDa avec deux autres protéines de membrane. Le complexe forme un pore à travers la membrane laissant passer les petites molécules (molécules jusqu'à 3,5 kDa). Ceci se traduit par une fuite d'eau et de NaCl (l'absorption des ions K^+ et HCO_3^- n'est pas modifiée), une fuite des acides aminés et autres cofacteurs de petite taille qui entraîne l'arrêt précoce de la synthèse des protéines. L'absorption du glucose est également réduite.

Les toxi-infections alimentaires à C. perfringens de type A sont caractérisées cliniquement par des douleurs abdominales aiguës, de la diarrhée, des nausées, de la fièvre et rarement par des vomissements. Les symptômes apparaissent habituellement 8 à 12 heures (6-24 heures) après ingestion d'aliments fortement contaminés. Les troubles disparaissent en général dans les 12 à 24 heures. La maladie est rarement fatale bien que certains cas mortels aient été rapportés chez les personnes âgées et/ou affaiblies et chez les jeunes enfants.

Considérant les entérocolites nécrosantes à C. perfringens de type C

Cette toxi-infection a été décrite en Allemagne après la guerre sous le nom de "darmbrand". La maladie était due à de la viande de conserve altérée, contenant des spores de C. perfringens de type C et elle concernait une population mal-nutrie. On a pu observer une disparition des cas lorsque la qualité nutritionnelle de l'alimentation s'est améliorée.

En Nouvelle-Guinée, l'infection est connue sous le nom de "Pig-bel" ; elle se rencontre également dans certaines contrées asiatiques, dans le Pacifique Ouest et en Amérique du Sud. Dans les contrées montagneuses de Nouvelle-Guinée, le "Pig-bel" coïncide avec les fêtes traditionnelles au cours desquelles de grandes quantités de viande de porc sont consommées. Les habitants ont habituellement une alimentation pauvre en protéines (régime végétarien) qui réduit la production d'enzymes protéolytiques capable d'abaisser l'activité biologique de la toxine β . De plus, la consommation de patates douces qui contiennent de puissants inhibiteurs de la trypsine est importante dans cette région. La maladie survient essentiellement chez les enfants, les adultes s'étant immunisés naturellement.

Le rôle de la toxine β est déterminant dans la toxi-infection ; elle est en effet responsable de la nécrose de l'intestin grêle. Les toxines δ et θ interviennent également. Dans les modèles expérimentaux, l'accumulation liquidienne, importante, est due aux toxines δ et θ . Les trois toxines auraient vraisemblablement une action cumulative voire synergique pour engendrer les symptômes de l'entérocolite.

On pourrait résumer la séquence des événements pathogéniques des entérocolites nécrosantes à C. perfringens de type C de la façon suivante : après ingestion de l'aliment contaminé par C. perfringens de type C, la bactérie se multiplie rapidement dans l'intestin. Elle sécrète la toxine β qui est responsable des phénomènes de nécrose et des hémorragies en même temps que les toxines δ et θ . Les individus en bonne santé qui sécrètent normalement de la trypsine dégradent les toxines au niveau de l'intestin grêle. Par contre, chez certains individus, la sécrétion de trypsine peut être faible et insuffisante par suite de la présence d'inhibiteurs trypsiniques (alimentation à base de patate douce). Dans ce cas, la toxine β n'est pas dégradée et occasionne les lésions d'entérocolite nécrosante (Pig Bell ou Darmbrand).

L'entérocolite nécrosante est une maladie rarissime mais grave. Elle est caractérisée par l'apparition soudaine de douleurs abdominales aiguës et de diarrhée (souvent sanglante), quelquefois de vomissements, enfin par des signes d'inflammation et de nécrose de l'intestin grêle dont le traitement nécessite l'usage des antibiotiques (β -lactamines).

II. Peut-on définir une relation dose/ effet pour ce germe (nombre de spores et / ou de cellules végétatives et / ou concentration en toxines) ?

Considérant les toxi-infections alimentaires à C. perfringens de type A

Les caractéristiques de la toxi-infection alimentaire due à C. perfringens de type A sont liées à l'entérotoxine qui est synthétisée au cours de la sporulation. Il est peu vraisemblable que cette toxine pré-formée dans l'aliment puisse être responsable d'un empoisonnement qui suppose en effet des taux de l'ordre du milligramme.

Un développement d'au moins 10^9 C. perfringens par gramme est considéré comme susceptible d'être à l'origine d'une intoxication alimentaire.

Considérant les toxi-infections alimentaires à C. perfringens de type C

Les caractéristiques de la toxi-infection alimentaire due à C. perfringens de type C sont liées principalement à la toxine β qui est produite par C. perfringens de type C. Cette toxi-infection a été décrite dans des populations très particulières (par exemple, alimentation à base de patate douce ne permettant pas la dégradation de la toxine β) et a été peu étudiée. C'est pourquoi, la dose infectieuse concernant les toxi-infections alimentaires à C. perfringens de type C, responsable d'entérocolites nécrosantes, n'est pas documentée à ce jour.

III. Quelles sont les méthodes (méthodes de référence et méthodes alternatives) d'analyses disponibles pour caractériser ce danger (recherche, dénombrement etc.), ainsi que leurs caractéristiques, intérêts / limites et contraintes pour leur mise en oeuvre ?

La mise en évidence de C. perfringens en hygiène alimentaire ou en santé humaine est réalisée jusqu'à présent par des techniques traditionnelles basées sur 3 étapes :

- l'isolement de la bactérie sur milieu gélosé,
- l'identification de l'espèce,
- la détermination du toxinotype.

Ces techniques d'identification sont lourdes à mettre en œuvre de façon systématique pour un grand nombre d'analyses et c'est pourquoi, dans bien des cas, certaines étapes de la caractérisation de cet agent ne sont pas réalisées en routine. C'est notamment le cas en hygiène alimentaire où le diagnostic dans les aliments n'est pas fondé sur l'identification spécifique de C. perfringens mais essentiellement sur la recherche des bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

1. Détection et identification de C. perfringens dans le cas des contrôles agro-alimentaires

1.1 Méthodes classiques

A l'heure actuelle, la détection dans les produits alimentaires de C. perfringens et a fortiori de ses toxines reste très peu pratiquée en routine. Les critères réglementaires (arrêté ministériel du 21/12/1979) se limitent essentiellement au dénombrement des bactéries sulfito-réductrices dans les échantillons. Ce test est insuffisant en ce qui concerne le dénombrement des C. perfringens en raison de son absence de spécificité vis-à-vis de cette espèce bactérienne. Dans certains cas (cuisses de grenouille ...), l'identification de ce microorganisme est pratiquée par les tests bactériologiques classiques mais cette approche a des limites certaines.

En bactériologie alimentaire, le dénombrement de *C. perfringens* est actuellement peu pratiqué car le critère réglementaire est la recherche des bactéries anaérobies sulfito-réductrices pour de nombreux produits. Cette recherche est réalisée dans des géloses profondes en présence d'alun de fer et sulfite de sodium, incubées à 46°C. On utilise aussi des géloses au TSC (Tryptose Sulfite à la Cyclosérine) incubées généralement à 37°C. Les *C. perfringens* peuvent être confirmés soit par les caractères biochimiques classiques (mobilité, nitrates, lactose, gélatine) ou par l'utilisation du milieu LS (Lactose-Sulfite). Les méthodes utilisées en bactériologie alimentaire sont décrites dans les normes AFNOR⁴.

Si l'identification de l'espèce *C. perfringens* est peu pratiquée en routine, la recherche des souches entérotoxigènes relève de l'exception. En effet, compte tenu des difficultés rencontrées pour mettre en évidence l'entérotoxine de *C. perfringens*, aucun laboratoire d'hygiène alimentaire ne détecte les souches productrices qui sont, d'après les quelques données épidémiologiques, responsables des toxi-infections alimentaires.

Ainsi, très exceptionnellement l'entérotoxine, et encore plus rarement d'autres toxines, sont recherchées dans les échantillons alimentaires. L'identification du caractère entérotoxigène des souches peut être réalisée à partir de cultures en phase de sporulation. Pour cela, des milieux spéciaux de sporulation doivent être utilisés, et la sporulation est contrôlée par examen au microscope à contraste de phase ou par culture après étape de chauffage (80°C pendant 10 minutes). La mise en évidence de l'entérotoxine est effectuée par recherche de son effet cytotoxique sur des cultures de cellules Vero, ou par des méthodes immunologiques (ELISA, agglutination sur billes de latex, immunodiffusion).

Plusieurs tests ont été décrits pour rechercher l'entérotoxine de *C. perfringens*, un seul réactif (test au latex) a été commercialisé. Cependant, la toxine préformée dans l'aliment n'étant que très rarement en cause dans les TIAC, il est peu utilisé et n'a de sens que dans le cadre de l'investigation de TIAC.

1.2 Méthodes moléculaires

En ce qui concerne la recherche par PCR, les progrès en biologie moléculaire sur la connaissance des toxines de *C. perfringens* ont permis de développer des méthodes d'identification moléculaire spécifiques de *C. perfringens*. Une PCR multiplex permettant d'amplifier simultanément deux fragments de la toxine alpha et de l'entérotoxine, a été mise au point. Le gène de la toxine α sert de marqueur de l'espèce *C. perfringens* (Fach et Guillou, 1993). Celle du gène de l'entérotoxine discrimine les souches entérotoxigènes (Fach et Popoff, 1997).

La recherche de *C. perfringens* dans les aliments peut se faire à partir de suspensions alimentaires en eau peptonée et incubées en anaérobiose pendant une nuit. Un échantillon de 1 ml de la culture d'enrichissement est centrifugé et le culot bactérien est utilisé pour l'amplification par PCR. Ce protocole permet de détecter en 24 heures la présence du microorganisme dans les aliments et d'identifier la présence de souches entérotoxigènes (Fach et al., 1993). Par ailleurs, une méthode semi-quantitative de PCR a été proposée en 1997, mais aucune application, ni validation, ne sont connues à ce jour (Miwa et al., 1997a ; Miwa et al., 1997b). Il est enfin possible, après isolement sur milieu gélosé et identification des clones par PCR duplex, de donner un aspect quantitatif plus précis au diagnostic. La technique permet alors, non seulement d'estimer le nombre de *C. perfringens* par gramme d'aliment, mais également de donner la proportion des clones entérotoxigènes par rapport aux clones non-entérotoxigènes.

⁴ Norme AFNOR V08 – 056 d'avril 1994 : Dénombrement des *Clostridium perfringens* par comptage des colonies à 37°C - Méthode de routine
NF EN 13401 de janvier 2003 : Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* – Méthode par le comptage des colonies (index de classement V08-019)

Ces techniques manquent d'évaluation en condition de routine, de standardisation et d'essais comparatifs. Les réactifs ne sont pas commercialement disponibles.

2. Diagnostic des affections à C. perfringens chez l'homme

2.1. Méthodes classiques

Chez les patients présentant des symptômes évocateurs de toxi-infection alimentaire, la recherche est généralement effectuée sur un échantillon de selles. Le titre en C. perfringens entérotoxigènes est élevé, supérieur ou égal à 10^6 par gramme de selles. La numération de C. perfringens est réalisée sur milieu gélosé au sang incubées en anaérobiose. Dans le domaine médical, l'isolement est de préférence réalisé sur milieu gélosé au sang de mouton, auquel on peut ajouter comme agent sélectif de la néomycine (100 mg/ml) ou de la D-cyclosérine (400 mg/ml), qui est plus spécifique de C. perfringens. Les colonies caractéristiques sont repiquées pour confirmation bactériologique (examen microscopique, acidification du glucose et du lactose avec production de lécithinase, gélatinase).

L'identification des clones entérotoxigènes s'effectue par repiquage en milieu de sporulation et recherche de l'entérotoxine par une méthode immunologique.

2.2. Méthodes moléculaires

La détection du potentiel génétique des souches de C. perfringens qui produisent l'entérotoxine a pu être réalisée, dans un premier temps, par une technique d'hybridation sur colonies (Van Damme-Jongsten et al., 1990).

Par un test PCR, Saito et al. (1992) ont identifié spécifiquement un fragment de 364 paires de bases (pb) sur le gène de l'entérotoxine. Ils ont pu par PCR détecter la présence de C. perfringens entérotoxigène sans isoler le microorganisme, mais après mise en culture pendant 18 heures de selles contaminées. Le test d'amplification génique qu'ils ont proposé était donc un peu moins rapide que les tests immunologiques qui peuvent détecter l'entérotoxine directement dans les selles.

Cependant, la méthode PCR, lorsqu'elle peut être effectuée directement sur les prélèvements de selles (Fach et Popoff, 1997), offre une alternative rapide à la méthode classique. Cette méthode peut aussi être utilisée à partir de colonies prélevées sur boîte d'isolement et directement incubées dans la solution de lyse bactérienne.

La validation des méthodes moléculaires pour le diagnostic sur la base des critères habituels tels que pouvoir prédictif, positif et négatif reste à faire.

2.3. Méthodes immunologiques

La recherche de l'entérotoxine directement dans les selles est également une méthode de diagnostic fiable et sensible. L'entérotoxine de C. perfringens est retrouvée à un taux de 100 ng à 1 mg par gramme de selles des patients atteints de toxi-infection à C. perfringens, alors qu'elle est absente chez les sujets sains. Le développement d'un test au latex par agglutination sur lame qui est spécifique de l'entérotoxine de C. perfringens, a permis de détecter un minimum de 0,1 ng/ml d'entérotoxine en 3 minutes (Fach et Popoff, 1997).

La validation des méthodes immunologiques pour le diagnostic sur la base des critères habituels tels que pouvoir prédictif, positif et négatif reste à faire.

Ces méthodes diagnostiques peuvent être utilisées dans un but d'études épidémiologiques, dans le cadre d'investigations de cas de TIAC.

IV. Est-il possible de préciser pour ce germe les valeurs des principaux paramètres ou combinaisons de paramètres et les conditions de préparation et de conservation du produit (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation etc.) ayant une incidence sur le comportement (croissance, inhibition et destruction du germe et / ou de ses toxines) de ce microorganisme ?

Les *C. perfringens* ne sporulent pas sur milieux usuels, mais certaines souches forment des spores typiquement clostridiennes dans des milieux spéciaux de sporulation (milieu de Duncan et Strong et autres). La résistance des spores à la chaleur est variable selon les souches. Certaines peuvent résister plusieurs heures à 100°C. De plus, les spores de certaines souches nécessitent un chauffage pour pouvoir germer. La bactérie a une croissance rapide en milieu riche et une relative aéro-tolérance, ce qui permet de la cultiver assez facilement. *C. perfringens* se multiplie rapidement et produit de l'hydrogène au cours de sa croissance, ce qui se traduit par la formation de gaz et contribue à la baisse du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. La température de culture varie entre 37 et 45°C mais la multiplication est possible entre 15 et 50°C. Les températures minimales de croissance sont de 15 à 18,5°C, les températures maximales de 50 à 51°C (Doyle et al., 1997).

La multiplication est fortement stimulée par la présence d'hydrates de carbone dans le milieu et par une atmosphère enrichie en CO₂ bien que ce gaz ne soit pas indispensable au développement. La multiplication n'est pas inhibée par la bile à 20 %, ni par une concentration de NaCl de 2 %. En revanche, elle est inhibée lorsque la concentration en NaCl est supérieure à 5%. Un pH de 5,5 à 8 leur est favorable ; cependant, la croissance est inhibée à pH inférieur à 5 ou supérieur à 8,3. En outre, les spores sont résistantes à la dessiccation et aux radiations.

Les toxi-infections alimentaires à *C. perfringens* rapportées surviennent généralement après consommation de viandes cuites et conservées dans de mauvaises conditions (refroidissement lent ou insuffisant). Les spores, thermorésistantes ou qui ont survécu à une cuisson insuffisante, peuvent alors germer et se multiplier dans l'aliment.

Les toxi-infections alimentaires à *C. perfringens* sont généralement dues au non-respect des règles d'hygiène. Les enquêtes relatives aux toxi-infections alimentaires collectives montrent que les principales erreurs de préparation culinaire sont les suivantes :

- temps de conservation des plats cuisinés longue à températures trop élevées,
- maintien des aliments à des températures dangereuses, c'est-à-dire entre 20 °C et 50°C, zone de température où la multiplication est très rapide,
- utilisation de restes,
- mise en consommation de denrées crues contaminées.

Pour inhiber la germination des spores, il convient soit de stériliser l'aliment, soit de le congeler ou le refroidir rapidement et maintenir la température de conservation à + 4°C.

Aujourd'hui, le développement de la restauration collective et l'apparition de nouvelles présentations des denrées, telles que les plats cuisinés sous vide, constituent un danger potentiel qui pourrait laisser présager une augmentation de ces TIAC dans les années à venir, si la chaîne du froid n'était pas suffisamment maîtrisée.

Bibliographie - Section *Clostridium perfringens*.

- Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. 1997. Food Microbiology- Fundamentals and Frontiers ; 3:53.
- Fach P, Popoff MR. 1997. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. Appl Environ Microbiol ; 63:4232-4236.
- Fach P, Guillou JP. 1993. Detection by in vitro amplification of the alpha-toxin (phospholipase C) gene from *Clostridium perfringens*. J Appl Bacteriol ; 74:61-66.
- Fach P, Delbart MO, Schlachter A, Poumeyrol M, Popoff MR. 1993. Apport de la technique d'amplification génique (PCR) au diagnostic des toxi-infections alimentaires à *Clostridium perfringens*. Med Mal infect ; 23:70-77.
- Hubert B, Dehaumont P, Quenum B, Pignault A. 1990. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1989. B.E.H. ; 16:65-67.
- Miwa N, Nishina T, Kubo S, Atsumi M. 1997a. Most probable number method combined with nested polymerase chain reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. J Vet Med Sci ; 59:89-92.
- Miwa N, Nishina T, Kubo S, Honda H. 1997b. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. J Vet Med Sci ; 59:557-560.
- Saito M, Matsumoto M, Funabashi M. 1992. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene by the polymerase chain reaction amplification procedure. Int J Food Microbiol ; 17:47-55.
- Van Damne-Jongsten M, Haagsma J, Notermans S. 1990. Testing of *Clostridium perfringens* type A strains isolated from piglets with diarrhea for the presence of the enterotoxin gene. Vet Rec ; 126:191-192.

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS LIE AUX PRODUITS DE LA MER

I. Quels sont les facteurs de pathogénicité des toxines liées à la présence de *Vibrio parahaemolyticus* présentant des gènes codant pour les toxines TDH et/ou TRH, ainsi que les facteurs associés permettant l'expression de cette pathogénicité ?

Les deux facteurs de pathogénicité de *Vibrio parahaemolyticus* sont les hémolysines TDH et/ou TRH, il n'est pas fait état de facteurs associés (FAO/OMS, 2002). Seules les souches de *Vibrio parahaemolyticus* possédant les gènes codant pour les hémolysines TDH et/ou TRH sont pathogènes (avis de l'Afssa du 2 décembre 1999).

II. Peut-on définir une relation dose/effet pour les toxines TDH et TRH et/ou pour le nombre de *V. parahaemolyticus* présentant des gènes codant pour la fabrication de ces toxines ?

Les données de la littérature sur la relation dose / réponse chez l'homme par voie alimentaire sont rares et incomplètes. L'unité d'expression de la dose, par exemple, est rarement ou incomplètement précisée. Dans certains cas, la relation dose / réponse est fondée sur l'ensemble de la population de *Vibrio parahaemolyticus* et, dans d'autres cas, elle concerne des souches présentant des facteurs de pathogénicité. Les données ci-dessous sont fournies pour information, mais n'apportent pas de réponse satisfaisante à la question :

- la dose infectante de *Vibrio parahaemolyticus* par ingestion a été évaluée à plus de 10^6 microorganismes par la Direction Générale de la Santé Canadienne (Fiche technique santé-sécurité, Canada, 2001).
- au Canada et aux USA en 1997 et 1998, l'étude des cas de gastroentérites liés à la consommation d'huîtres récoltées dans le Pacifique Nord Ouest a montré la présence de souches de *Vibrio parahaemolyticus* possédant le gène *tdh*. Le taux de contamination de ces coquillages était inférieur à 200 UFC par gramme de chair d'huître, ce qui indique que la maladie chez l'homme peut apparaître à des taux nettement inférieurs à ceux habituellement envisagés (CDC, 1999).

Une relation dose-réponse a été établie, mais sans tenir compte de la présence des gènes codant pour les hémolysines (rapport FAO/OMS, 2002).

III. Est-il possible de définir la relation entre la concentration en *V. parahaemolyticus* présentant des facteurs de pathogénicité et les quantités de toxines produites ?

Il n'est pas possible de définir cette relation. En effet, la maladie (gastro-entérite) est provoquée par l'une des deux hémolysines TDH et/ou TRH, mais uniquement lorsque cette hémolysine est produite par des bactéries qui se multiplient dans le tube digestif (FAO/OMS, 2002).

IV. Est-il possible de préciser les valeurs des principaux paramètres ou combinaison de paramètres et les traitements associés (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation, etc.) permettant soit d'inhiber la multiplication de *V. parahaemolyticus* et/ou la production de toxines, soit de les détruire ?

Considérant les données disponibles dans la littérature scientifique

Les traitements peuvent avoir comme effet de réduire la quantité de vibrions pathogènes mais avec des niveaux d'efficacité différents.

Le rapport FAO/OMS (2002) donne des indications semi-quantitatives sur les performances des traitements (Tableau 5) :

- l'assainissement dans des bassins d'épuration, qui est efficace pour d'autres bactéries (certaines entérobactéries), ne l'est pas réellement pour *Vibrio*.
- la congélation n'est pas suffisante pour réduire de manière significative la population de *Vibrio*.
- en revanche, les traitements suivants ont une efficacité reconnue permettant une réduction significative : les hautes pressions, l'irradiation et les traitements thermiques.

Tableau 5. Comparaison de l'efficacité d'un certain nombre de techniques en faveur de la réduction de *Vibrio* spp.

Atténuation	Comparaison de l'efficacité de la réduction de <i>Vibrio</i> spp.
Hautes pressions	+++
Refroidissement rapide	+ / ++
Irradiation	+++
Pasteurisation	+++
Congélation et décongélation	++
Épuration	+ / -
Traitement industriel par la chaleur	+++

- pas d'effet
- + légère réduction
- ++ réduction moyenne
- +++ réduction significative

La combinaison de certaines techniques peut également être utilisée, par exemple les hautes pressions et la congélation, l'épuration et les hautes pressions ou la pasteurisation.

Les paramètres relatifs aux traitements thermiques doivent être définis au cas par cas en fonction notamment de la charge bactérienne. Les données scientifiques suivantes relatives à *Vibrio cholerae* peuvent servir de support pour les définir (Mossel 1995) :

« D (temps de réduction décimale) pour un produit d' a_w 0,99 et de pH compris entre 6,5 et 7 :

- 2,7 minutes à 60°C
- 1,6 minutes à 65.5°C
- 18 secondes à 72°C »

En tout état de cause, un contrôle a posteriori permet de vérifier éventuellement l'efficacité du traitement.

Considérant l'avis de l'Afssa du 2 décembre 1999 relatif à la pathogénicité de vibrions susceptibles d'être détectés dans les produits de la pêche

Considérant que les connaissances relatives à V. parahaemolyticus ont évolué, et que certaines données scientifiques sur lesquelles s'appuyaient cet avis sont désormais à réactualiser⁵. C'est ainsi que :

- Cet avis proposait une évaluation du risque fondée sur le dénombrement de Vibrio parahaemolyticus. Compte tenu des grandes incertitudes relatives à l'évaluation quantitative du risque à partir du dénombrement des Vibrio parahaemolyticus totaux, compte tenu des problèmes méthodologiques (la méthode NPP n'est pas réalisable en routine parce que trop lourde et peu reproductible et les méthodes moléculaires n'ont pas encore fait l'objet de normalisation nationale ou internationale), ce dénombrement ne peut pas encore être proposé aujourd'hui pour apprécier le niveau de risque lié à la consommation d'une denrée contaminée par Vibrio parahaemolyticus. En revanche, compte-tenu de la possibilité de mettre en évidence la présence des gènes codant pour les hémolysines TDH et TRH, le critère présence/absence de Vibrio parahaemolyticus pathogènes (c'est-à-dire possédant les gènes codant pour les hémolysines TDH et TRH) permet une réelle appréciation du risque.
- L'avis évaluait également la "pertinence de la prise en compte de l'état cru ou cuit du produit et de son mode de consommation pour l'évaluation du risque en matière de denrées contaminées par Vibrio". A cet égard, l'avis était formulé ainsi :
 - « - Considérant que la cuisson des produits de la mer n'est pas toujours suffisante pour inactiver les Vibrio,
 - Considérant que les hémolysines de Vibrio parahaemolyticus sont thermostables,
 L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que le caractère cru ou cuit du produit n'est pas une donnée pertinente pour évaluer le risque de denrées contaminées par Vibrio. »

Cet avis soulignait le fait que les hémolysines de Vibrio parahaemolyticus sont thermostables. Cette constatation pouvait faire craindre l'expression d'un pouvoir pathogène par des produits de la pêche traités de telle sorte qu'il y avait absence de Vibrio parahaemolyticus vivants mais présence éventuelle de l'une ou l'autre de ces hémolysines.

Cette question a été évoquée par le Comité du Codex Alimentarius pour les poissons et les produits de la pêche lors de la consultation d'experts FAO/OMS (août 2002) de la façon suivante :

"Pour Vibrio parahaemolyticus, les toxi-infections alimentaires sont-elles provoquées par la toxine résistante à la chaleur produite par le pathogène ou bien par le pathogène lui-même ?

- La maladie est provoquée par la toxine mais uniquement si celle-ci est produite dans l'intestin à la suite de la colonisation de ce dernier par une souche produisant la TDH, la TRH ou les 2 toxines."

Il ressort de cette réponse que l'inactivation de la bactérie est suffisante pour maîtriser le danger lié à une contamination par Vibrio. La cuisson peut donc être considérée comme un traitement recevable sous réserve qu'elle soit réalisée dans des conditions suffisantes pour inactiver les Vibrio.

⁵ L'avis du 2 décembre 1999 fera l'objet d'une réactualisation par l'Afssa de façon à prendre en compte les nouveaux éléments.

Bibliographie - Section *Vibrio parahaemolyticus* liés aux produits de la mer.

- Afssa. Avis du 2 décembre 1999 relatif à la pathogénicité de vibrions susceptibles d'être détectés dans les produits de la pêche.
- Anonyme. 2001. Fiche technique santé-sécurité. Direction Générale de la Santé Canadienne. (<http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/msds165f.html>)
- Calik H, Morrissey MT, Reno PW, An H. 2002. Effect of high pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in oysters. *J Food Science* ; 67:1506-1510.
- CDC. 1999. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *MMWR* ; 48:48-51.
- Cook DW, Ruple AD. 1989. Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in postharvest shellstock oysters. *J Food Prot* ; 52:343-349.
- Cook DW. 1999. Effect of heat and freezing treatment on *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. Unpublished data.
- Eyles MJ, Davey GR. 1984. Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. *J Food Prot* ; 47:703-706.
- FAO/WHO. Food Safety Consultations, Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation (Bangkok, Thailand, août 2002). § 6.4 question 2.
- Gooch JA, DePaola A, Kaysner CA, Marshall DL. 1999. Postharvest growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters stored at 26° C and 3° C. Abstracts of the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract # P52.:521.
- Greenberg EP, Duboise M. 1981. Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* in hardshell clams. Abstracts of the 81st General Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No. Q93:216.
- Johnson HC, Liston J. 1973. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to cold in oysters, fish fillets and crabmeat. *J of Food Science* ; 38:437-441.
- Johnson WG, Salinger AC, King WC. 1973. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. *Applied Microbiology* ; 26:122-123.
- Mossel DA. 1995. Essentials of the microbiology of foods. Chap. Control of microbial safety. 217-267.

BACILLUS CEREUS**I. Quelles sont les relations, au plan épidémiologique, entre *B. cereus* et les infections alimentaires chez l'homme en France ?**

Les seules sources disponibles, au niveau national, sont les données de l'Institut National de Veille Sanitaire, publiées dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire. Les résultats des études épidémiologiques réalisées sont réunies dans le Tableau 6 (Anonyme, BEH)

A noter qu'en 1998, un épisode de toxi-infection alimentaire à *Bacillus cereus* s'est produit dans une maison de retraite. Quatre décès sont survenus, ce qui est tout à fait exceptionnel pour ce type de microorganisme. Les investigations complémentaires menées ont conclu à la présence dans l'aliment d'une souche hypervirulente, fortement productrice d'entérotoxine non hémolytique et d'une autre toxine non encore décrite.

Tableau 6 Estimation des TIAC à *B. cereus* : fréquence et gravité

Année	Nb foyers à <i>B. cereus</i> (%*)	Nb malades	Hospitalisations	Décès
2001	8 (2,9 %)	139	9	0
1999-2000	15 (2,8 %)	241	24	0
1998	7 (1,9 %)	92	15	4
1997	1 (0,4 %)	25	0	0
1996	2 (0,8 %)	42	0	0
1995	2 (1,1 %)	58	13	0
1994	4 (1 %)	80	nd	nd
1993	3 (1 %)	81	nd	nd

* pourcentage calculé : Nombre de foyers à *B. cereus* par rapport au nombre de foyers de TIAC pour lesquelles l'agent causal a été déterminé.

Il faut souligner la faible signification des chiffres ci-dessus, liée en particulier

- à la facilité de confondre une toxi-infection alimentaire collective à *Bacillus cereus* avec celles provoquées par *Clostridium perfringens* (syndrome gastro-entérique), ou par *Staphylococcus aureus* (syndrome émétique)
- au non recensement en tant que telle de l'étiologie *Bacillus cereus* par les réseaux de surveillance épidémiologique jusqu'à un passé très récent
- au fait que la recherche de *Bacillus cereus* est rarement demandée en routine en l'absence de critères microbiologiques
- à la taxonomie encore imparfaitement établie de la bactérie

II. Quels sont les facteurs de pathogénicité de *B. cereus* ? Quels sont les rôles respectifs des spores, des cellules végétatives et des toxines produites éventuellement dans l'aliment dans l'expression de cette pathogénicité ?

Bacillus cereus est à l'origine de deux types d'intoxications transmises par les aliments : une intoxication émétique dont les symptômes sont caractérisés par des vomissements et une intoxication diarrhéique. Dans quelques cas, l'association des deux symptômes a été observée (Kramer and Gilbert, 1989).

1. Intoxication émétique.

L'intoxication émétique survient après une courte période d'incubation de 1 à 5 h. Elle est caractérisée par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et est accompagnée de diarrhée pour environ 1/3 des cas (Kramer et Gilbert, 1989). Un petit peptide cyclique, le céréulide, est la toxine responsable des symptômes émétiques (Agata et al., 1994). Extrêmement stable, la toxine émétique est produite dans l'aliment lors de la croissance bactérienne, peut persister après la disparition des bactéries, et résiste à de nombreux traitements, comme la cuisson, et aux conditions physico-chimiques du tractus digestif. Par exemple, plusieurs cas d'intoxications émétiques proviendraient de riz cuit à l'avance, conservé quelques heures sans réfrigération puis frit pour la préparation de plats asiatiques (Kramer et Gilbert, 1989). La cuisson du riz n'ayant pas détruit les spores de *Bacillus cereus*, la bactérie a pu se développer et produire la toxine émétique qui, thermostable, n'a pu être éliminée par la friture.

Les souches responsables d'intoxications émétiques semblent former un groupe très homogène. Toutes les souches connues sont incapables d'hydrolyser l'amidon, n'utilisent ni le mannose ni la salicine, ne produisent pas la toxine HBL et appartiendraient à uniquement 3 sérotypes, le sérotype H1 étant prédominant (Pirttijarvi et al., 1999; Raevuori et al., 1977). Pirttijarvi et al. (1999) ont en outre mis en évidence une relation clonale, sur la base de leurs ribotypes, entre des souches émétiques d'origines géographiques très différentes et isolées à des dates très espacées. La proportion de souches émétiques dans les aliments et l'environnement n'est pas clairement déterminée. Le pourcentage d'isolats n'hydrolysant pas l'amidon peut donner une indication maximale (les souches n'utilisant pas l'amidon ne sont pas toutes émétiques). Suivant ce critère, les souches émétiques représenteraient au plus 2% à 11% des isolats de produits laitiers et de l'environnement de fermes laitières (te Giffel et al., 1995). Sur un ensemble de souches de provenance diverse, Logan et Berkeley (1984) rapportent uniquement 4% de souches n'utilisant pas l'amidon.

2. Intoxication diarrhéique

L'intoxication diarrhéique est caractérisée par une diarrhée abondante, accompagnée de crampes intestinales et survient 8 à 16 heures après ingestion de l'aliment contaminé (Granum, 1997). Trois entérotoxines ont été clairement reliées à des épisodes diarrhéiques : les complexes HBL et NHE, chacun formé de trois protéines (Granum, 1997), ainsi que la protéine CytK (Lund et al., 2000). Toutefois, une même souche produisant souvent plusieurs de ces 3 entérotoxines, la part respective de ces différentes toxines est difficile à distinguer. L'entérotoxine HBL, formée de 3 protéines codées par 3 gènes en opéron est la mieux décrite. Les 3 protéines sont indispensables à l'activité biologique (Granum, 1997). Cette toxine est hémolytique, dermonécrosante, cytotoxique sur cultures cellulaires Caco2 ou Véro, positive au test de l'anse intestinale ligaturée de lapin. La toxine NHE a été décrite dans une souche responsable d'intoxication diarrhéique et ne produisant pas la toxine HBL. La toxine CytK a été décrite plus récemment dans une souche responsable d'intoxication et ne possédant ni HBL ni NHE.

Les trois entérotoxines HBL, NHE et CytK ne semblent pas réparties de façon équivalente au sein des populations isolées d'aliment. La production des toxines HBL et NHE a été recherchée à l'aide des tests immunologiques commercialisés, qui détectent l'une des trois protéines du complexe toxique. Dans d'autres études, la présence d'un ou plusieurs gènes des opérons hbl et nhe a aussi été recherchée par PCR. Dans ce dernier cas, une sous-estimation du nombre de souches positives est vraisemblable puisque 36% (pour hbl) et 58% (pour nhe) de souches issues d'aliments et produisant ces toxines se sont avérées négatives en PCR pour au moins un gène de l'opéron, alors que la présence du gène a pu être démontrée par hybridation (Guinebretière et al., 2002). Aucun anticorps dirigés contre la toxine CytK n'étant disponible, seule la recherche du gène cytK est actuellement possible. Toutefois, dans l'étude citée ci-dessus (Guinebretière et al., 2002), la recherche de cytK par PCR n'a donné lieu à aucun résultat faussement négatif. Suivant les travaux de Beattie et Williams (1999), Granum et al. (1993), Griffiths (1990), Odumeru et al. (1997), sur un nombre de souches isolées de produits laitiers allant de 43 à 85, 51 à 85% des souches produisaient la toxine HBL et 85 à 100% la toxine NHE. Parmi des souches issues d'épices et de légumineuses, la toxine NHE a été détectée avec une fréquence de 95 à 100%, la toxine HBL avec une fréquence de 54 à 95% (Rusul et Yaacob, 1995). La toxine NHE serait

donc plus fréquemment produite par B. cereus que la toxine HBL. De même, l'opéron *nhe* serait plus largement distribué que l'opéron *hbl*, le gène *cytK* étant le moins répandu : sur 96 souches issues d'aliments divers et de cas d'intoxications diarrhéiques, seules deux souches étaient négatives pour *nhe* contre 22 souches pour l'opéron *hbl* et 49 souches pour le gène *cytK* (Guinebretière et al., 2002). Globalement, les souches ne possédant aucune des trois entérotoxines semblent très rares (Choma et al., 2000 ; Guinebretière et al., 2002 ; Rusul et Yaacob, 1995).

Les quantités de toxines HBL et NHE produites par des souches isolées d'aliments peuvent être extrêmement variables (Beattie et Williams, 1999 ; in't Veld et al., 2001). Par exemple, l'indice de production de HBL, au sein de souches possédant les gènes *hbl* pouvait varier de 2 à plus de 128 (Guinebretière et al., 2002). De même, l'activité cytotoxique sur des lignées cellulaires Caco2, qui mesure de manière satisfaisante l'activité globale des entérotoxines produites par B. cereus (Granum, 1997), variait dans des proportions de 1 à 80 parmi des souches issues de produits à base de légumes (Choma et al., 2000). Les souches présentes dans les aliments n'ont donc pas toutes les mêmes entérotoxines et les produisent avec des niveaux très variables. Les souches issues d'intoxications diarrhéiques semblent être de fortes productrices de toxines diarrhéiques (Guinebretière, 2002).

Les toxines HBL et NHE ont été mises en évidence dans des souches des espèces proches de B. cereus, Bacillus thuringiensis en particulier (Gaviria-Rivera, 2000). Il a déjà été fait état d'une intoxication causée par une souche de B. thuringiensis (Jackson, 1995). Des souches d'autres espèces de Bacillus (B. amyloliquefaciens, B. circulans, B. pasteurii) produiraient des toxines similaires aux toxines NHE et HBL de B. cereus (Phelps et McKillip, 2002), sans que ces espèces n'aient été identifiées comme agents d'intoxications alimentaires.

L'intoxication par ingestion de toxines diarrhéiques préformées dans l'aliment paraît peu probable (Granum, 1997) car les protéines toxiques sont labiles et ne résisteraient pas aux protéases digestives. La durée d'apparition des symptômes, relativement longue, laisse supposer que les toxines sont produites après croissance de B. cereus dans l'intestin grêle. En outre, la production de toxines diarrhéiques survient en phase stationnaire de croissance, généralement avec une population de B. cereus de 10^7 à 10^8 UFC/g d'aliment (Granum et Baird-Parker, 2000). Dans la mesure où des cas d'intoxication diarrhéique ont été rapportés avec une quantité de cellules ingérées bien inférieure à ces taux de contamination (voir le paragraphe concernant la relation dose/réponse), il est peu vraisemblable que les toxines diarrhéiques aient été préformées dans l'aliment. L'intoxication par ingestion de toxines diarrhéiques préformées dans l'aliment serait donc exceptionnelle, peut être possible si l'aliment a pu permettre une forte croissance de B. cereus avant sa consommation (Granum, 1997).

L'ingestion de cellules bactériennes suivie de leur développement dans l'intestin grêle et la production de toxine diarrhéique serait le mode le plus vraisemblable d'intoxication (Granum, 1997). Toutefois, aucune donnée publiée ne permet à l'heure actuelle de déterminer la part que représente les spores et les cellules végétatives de B. cereus. Les quelques éléments pouvant servir de base à une réflexion seront discutés dans le paragraphe concernant la relation dose/réponse ci-dessous.

III. Peut-on définir une relation dose/effet pour ce germe (nombre de spores et/ou de cellule végétative et/ou concentration en toxines) ?

1. Intoxication émétique

La relation entre la dose de B. cereus présente dans l'aliment et la probabilité de toxico-infection n'a pas beaucoup de sens pour l'intoxication émétique puisque la toxine, très stable, peut persister longtemps après la disparition de la bactérie. La dose de toxine émétique ingérée suffisante pour l'apparition des symptômes a été estimée sur un modèle animal, le petit singe Suncus murinus, à 8 µg/kg (Shinagawa et al., 1995). En conditions de laboratoire, la toxine émétique est produite durant la phase stationnaire de croissance, lorsque la population bactérienne a atteint 10^8 UFC/ml (Häggblom et al., 2002). La culture peut alors contenir 10 µg/ml de toxine. La production de la toxine émétique par une même souche de B. cereus est en outre très fortement influencée par la nature du milieu et les conditions d'incubation. Par exemple, la toxine émétique ne serait pas produite au-dessus

de 37°C et sa production serait plus élevée entre 15 et 20°C qu'à 30°C (Finlay et al., 2000 ; Häggblom et al., 2002). Une forte production de toxine émétique a été observée dans du riz cuit, alors que la même souche produisait peu de toxine dans des aliments carnés et des ovo-produits (Agata et al., 2002). En milieux liquides, l'agitation pourrait multiplier par 100 la production de toxine émétique (Häggblom et al., 2002 ; Agata et al., 2002). Enfin, la quantité de toxine produite dans des conditions identiques par des souches émétiques différentes peut être très variable (Häggblom et al., 2002).

2. Intoxication diarrhéique

La relation dose/réponse pour les intoxications diarrhéiques est mal connue à cause du faible nombre de données épidémiologiques. Le nombre de B. cereus retrouvé dans des aliments à l'origine de cas diarrhéiques serait au minimum de 10^3 UFC/g et au maximum de 10^9 UFC/g (Kramer et Gilbert, 1989 ; Notermans et al., 1997). Quant à ces valeurs maximales, il n'est pas certain que beaucoup d'aliments puissent porter de si fortes populations de B. cereus sans être profondément altérés. Granum et Baird-Parker (2000) estiment que le nombre de B. cereus ingérés par les patients varient le plus souvent de 10^5 UFC à 10^8 UFC ; Becker et al. (1994) citent 7 épisodes diarrhéiques représentant au total 78 cas pour lesquels la dose de B. cereus ingérée était sans doute comprise entre 10^3 et 10^5 UFC.

Il faut noter qu'aucune distinction n'était faite, dans les travaux cités ci-dessus, entre spores et cellules végétatives. Les aliments incriminés étaient a priori favorables à la croissance de B. cereus (produits à forte humidité et à pH sans doute proche de la neutralité). Le nombre de cellules végétatives était donc probablement plus élevé que le nombre de spores. Si ce sont les spores et non les cellules végétatives qui sont responsables de l'intoxication, les données citées ci-dessus n'ont aucune valeur.

La population de cellules végétatives ingérées est certainement fortement réduite par l'acidité de l'estomac, tandis que les spores ne le sont pas (ou très peu affectées). Par exemple, des travaux en cours (non encore publiés) effectués dans le cadre d'un projet de recherche co-financé par le Ministère de l'Agriculture (AQS, R00/13) ont permis d'obtenir les résultats suivants :

- l'effet du contenu de l'estomac sur B. cereus a été simulé in vitro en présence d'un aliment ayant un fort pouvoir protecteur (lait) contre les effets de l'acidité. Les cellules végétatives survivent sans diminution de la population sur 6 heures à pH 4, mais la population est réduite de 3 puissances de dix en 1 heure à pH 3,6.
- par contre, la quantité de spores diminue de moins de 0,5 puissance de dix en 6 heures à pH 1,5.

Les spores de B. cereus survivent donc certainement mieux au passage de l'estomac que les cellules végétatives, et de ce point de vue, il est possible de penser qu'un nombre plus restreint de spores que de cellules végétatives suffisent à provoquer une intoxication diarrhéique. Toutefois, la cinétique de production des toxines diarrhéiques à partir de spores et de cellules végétatives, dans les conditions de l'intestin grêle ne sont pas connues. Les spores mettent sans doute plus de temps à entrer en phase de croissance.

Les spores de certaines souches de B. cereus ont la capacité d'adhérer à des cellules de l'épithélium (Caco 2), d'y germer et de produire leurs toxines en contact avec les cellules (Andersson et al., 1998). Les auteurs considèrent que les souches possédant cette propriété pourraient être à l'origine de cas diarrhéiques particulièrement sévères et être dangereuses pour une dose ingérée plus faible. Toutefois, sur les 4 souches isolées de cas d'intoxication, seule une souche produisait des spores adhérent aux cellules Caco 2. Ce mécanisme n'est certainement pas généralisable à l'ensemble de B. cereus.

IV. Quelles sont les méthodes (méthodes de référence et méthodes alternatives) d'analyses disponibles pour caractériser ce danger (recherche, dénombrement, etc), ainsi que leurs caractéristiques, intérêts/limites et contraintes pour leur mise en œuvre ?

Considérant la détection du microorganisme,

La méthode de référence est décrite dans la norme ISO 7932⁶ intitulée « Directives générales pour le dénombrement de Bacillus cereus – Méthode par comptage des colonies à 30°C ». Le principe de cette méthode est le dénombrement des colonies en surface d'une gélose sélective (gélose dite de Mossel ou gélose peptone-mannitol-rouge de phénol-polymyxine B-jaune d'œuf) pendant 24 et éventuellement 48 heures à 30°C en aérobiose.

Le dénombrement est réalisé par étalement sur milieux sélectifs contenant de la polymyxine, du jaune d'œuf, du mannitol et un indicateur coloré, suivant les normes AFNOR NF V 08-058⁷ et ISO 7932. Les colonies du groupe Bacillus cereus sont caractérisées par une auréole de lécithinase et par l'absence d'acidification du milieu, la bactérie n'utilisant pas le mannitol. La confirmation de l'identité des colonies nécessite l'observation des spores, la mise en évidence de l'hémolyse et de la mobilité⁷ ou une série de tests biochimiques⁶. Les galeries de tests miniaturisés API-50CHB et API-20E ne permettent que de s'assurer de l'appartenance d'un isolat au groupe Bacillus cereus. Les résultats obtenus par identification à l'aide de ces galeries miniaturisées correspondent parfaitement aux identifications obtenues par séquençage de l'ADNr 16s (Guinebretière et al., 2001).

Ces techniques de microbiologie « classique » sont considérées comme sensibles, mais peu spécifiques : elles peuvent ne pas permettre la distinction entre Bacillus cereus et les autres Bacillus biochimiquement apparentés, comme Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoïdes, Bacillus laterosporus et les formes avirulentes de Bacillus anthracis (B. anthracis se distingue normalement par l'absence d'hémolyse. B. mycoïdes possède habituellement une morphologie particulière avec des colonies rhizoïdes et très faiblement hémolytiques. B. thuringiensis ne peut se distinguer de B. cereus que par la présence du cristal parasporal).

Si l'on désire mettre en évidence les spores de Bacillus cereus, un traitement thermique préalable de la prise d'essai (par exemple 15 minutes à 70°C) permet de détruire les formes végétatives et inflige aux spores un « choc thermique » favorisant leur germination.

D'autres techniques ou milieux sont proposés dans la littérature scientifique, mais la comparaison de leurs performances avec les techniques classiques n'ont fait l'objet que de peu d'évaluations sérieuses. Ainsi, une méthode microcalorimétrique a été récemment décrite (Arakawa et al., 2003) de même qu'une méthode utilisant un milieu chromogène qui met en évidence la phosphatidyl-inositol phospholipase C de Bacillus cereus (Sperber, 2001)

En biologie moléculaire, la technique d'amplification couplée à une endonucléase de restriction (PCR-RE) décrite par Manzano et al. (2003) constitue une voie d'abord utilisable sous peu dans les laboratoires de référence.

Considérant la mise en évidence des toxines de B. cereus

Il n'existe pas de méthode simple et rapide pour détecter la toxine émétique de B. cereus dans un aliment ou pour mettre en évidence la production de toxine émétique par une souche de B. cereus. La toxine émétique doit être extraite par des solvants organiques et sa mise en évidence nécessite une analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Håggblom et al., 2002). Elle peut aussi être mise en évidence par des tests biologiques sur

⁶ NF ISO 7932. Directives générales pour le dénombrement de Bacillus cereus - Méthode par comptage des colonies à 30°C. In : « Analyse Microbiologique. Tome 1. Méthodes Horizontales ». Editions Paris La Défense : AFNOR. indice de classement V 08-023. pp. 203-218

⁷ NF V 08-058. Dénombrement de Bacillus cereus par comptage des colonies à 30°C. In : « Analyse Microbiologique. Tome 1. Méthodes Horizontales ». Editions Paris La Défense : AFNOR. pp. 445-457

cultures cellulaires (Finlay et al., 1999) ou sur spermatozoïde de porc (Hägglom et al., 2002).

La présence des gènes des entérotoxines connues peut être recherchée dans les souches de *B. cereus* par amplifications PCR, mais le polymorphisme des gènes rend difficile leur amplification dans toutes les souches de *B. cereus* (Guinebretière et al., 2002). La production des entérotoxines HBL et NHE par une souche de *B. cereus* peut être mise en évidence et quantifiée grâce à des tests immunologiques commerciaux disponibles (technique de type ELISA sandwich ou technique d'agglutination sur billes de latex « sensibilisées » avec un sérum antitoxine). Il n'existe pas actuellement de méthodes simples pour détecter et quantifier la production de la toxine CytK.

V. Est-il possible de préciser pour ce microorganisme les valeurs des principaux paramètres ou combinaisons de paramètres et les conditions de préparation et de conservation du produit (traitement thermique, ionisation, salage, séchage, congélation, etc ...) ayant une incidence sur le comportement (croissance, inhibition et destruction du germe et /ou de ses toxines) de ce microorganisme ?

Une synthèse très complète de cette problématique a été effectuée dans l'ouvrage de l'ICMSF (1996).

Les conditions écologiques permettant la croissance sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Conditions écologiques permettant la croissance de *B. cereus*

	Valeur minimale	Valeur optimale	Valeur maximale
Température	4	30 à 40	55
pH	5	6 à 7	8,8
Activité de l'eau	0,93	--	--

Concernant tous les autres paramètres (thermorésistance, sensibilité au sel, à l'ionisation, etc ...), les données dépendent de façon très étroites des conditions expérimentales adoptées et du milieu dans lequel le paramètre est éprouvé.

Il n'est donc pas possible de définir des valeurs « moyennes » qui ne correspondraient à rien et seraient entachées d'inexactitude scientifique.

Par exemple, une étude de Valero et al. (2003) montre que des traitements tels que le pH, la cuisson ou la température de stockage influent sur la croissance de ce microorganisme. Ces auteurs montrent une action synergique entre une acidification à pH 5,0 et une réfrigération à température inférieure à 8°C inhibant la croissance de *B. cereus*. Les auteurs détaillent l'influence du temps de cuisson et des conditions de stockage sur ce microorganisme mais les résultats présentés sont difficilement extrapolables à d'autres conditions que celles présentées dans l'étude.

VI. Quels sont les aliments dans lesquels la présence de *B. cereus* est à redouter en termes de Santé Publique⁸ ? Etude sur l'écologie de *B. cereus* dans les aliments

Comme sa croissance ne nécessite pas de besoins nutritionnels particuliers, *B. cereus* est une bactérie ubiquitaire du sol, fréquemment retrouvée à faible concentration dans les aliments crus, séchés ou transformés (Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : *Bacillus cereus*", 2001). De plus, sa capacité à sporuler permet une dissémination facile de ce microorganisme. C'est pourquoi, il contamine de nombreux types

⁸ Cette question, formulée par le groupe « Pathogènes », n'a pas fait l'objet d'une validation par le CES « Microbiologie » mais d'une relecture d'un expert de l'Afssa.

d'aliments et préférentiellement les aliments d'origine végétale. Il est également fréquent dans certains produits laitiers.

La contamination de l'homme par cet agent pathogène se réalise fréquemment par l'ingestion d'aliments et de plats cuisinés conservés à température ambiante après cuisson ou par ingestion de graines germées (Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : *Bacillus cereus*", 2001).

La toxine émétique est fréquemment associée (mais non exclusivement) à la consommation de denrées à base de pâtes ou de riz cuit contaminé. La forme diarrhéique est plutôt reliée à la consommation de produits végétaux et carnés (Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : *Bacillus cereus*", 2001).

Les aliments les plus impliqués dans les TIAC à *B. cereus* émétique sont les plats asiatiques en raison des aliments utilisés et de leur mode de préparation. Ainsi le temps de génération, calculé dans du riz bouilli maintenu à 35 °C, correspond à 26 - 31 minutes ; dans ces conditions, la toxine émétique est détectable au bout de 4 heures (Agata *et al.*, 2002).

En raison de ses caractéristiques de croissance (température optimale de croissance de 30 à 37°C avec un minimum de 5°C et un maximum à 48°C ; croissance possible jusqu'à une concentration en chlorure de sodium égale à 7,5 %), *B. cereus* peut se multiplier au sein de nombreux aliments (Valero *et al.*, 2003). De plus, ce microorganisme croît dans des conditions d'*aw* supérieure ou égale à 0,95 et dans une gamme de pH de 4,3 à 9,0 selon les souches et le mode d'acidification choisie (Lund, 1990). Ainsi l'adjonction d'acide acétique sous forme de vinaigre, par exemple, permet d'inhiber la croissance de *B. cereus* et la synthèse des toxines (Agata *et al.*, 2002).

B. cereus n'est pas un germe se multipliant facilement en présence de flore annexe aux températures de réfrigération mais il cultive bien sur des aliments préalablement chauffés puis lentement refroidis. La cuisson provoque la destruction des formes végétatives mais non celle des spores. Ce traitement thermique, conduisant à la germination des spores et à la destruction d'autres microorganismes, permet la croissance du *B. cereus* dans des conditions optimales (Granum et Lund 1997).

Les spores des souches psychrophiles ont la possibilité de se multiplier dès 5°C : une intoxication après conservation d'aliments au froid positif n'est donc pas à exclure (Afssa "Fiche de description d'un danger microbiologique : *Bacillus cereus*", 2001). D'autre part, les spores de *B. cereus* sont thermotolérantes et résistent à la cuisson à basse température (Valero *et al.*, 2003).

L'incidence de *B. cereus* dans divers types d'aliments a été calculée parmi les aliments les plus impliqués dans les TIAC (hormis les produits séchés peu incriminés) (Tableau 8).

Kramer et Gilbert (1989) citent principalement des toxi-infections dues à la consommation de ragoûts, de viandes en sauce, de volailles au barbecue, de légumes crus et cuits et occasionnellement du poisson, des pâtes, du lait ou des crèmes glacées.

Les autres aliments ayant été impliqués, à des degrés divers, lors de TIAC sont les salades ou purées de féculents, le saucisson de foie, les pâtisseries, les puddings, les potages et bouillons de légumes, les épices, les céréales (MMWR, 1986 ; MMWR, 1994).

Tableau 8. Incidence de *B. cereus* dans divers types d'aliments (Te Giffel *et al.*, 1997)

Aliments		Incidence (%)	Dénombrement (UFC/g ou /ml)
Riz	Riz cru	40-100	10^2-10^3
	Riz bouilli	10-93	10^1-10^7
	Riz poêlé	12-86	10^1-10^5
Lait et produits laitiers	Lait cru	7-35	10^1-10^2
	Lait pasteurisé	2-35	10^1-10^4
	Crèmes glacées	20-25	10^1-10^4
Produits desséchés	Lait en poudre	15-75	10^1-10^3
	Herbes et Epices	10-75	10^1-10^6
	Céréales	56	10^2-10^5
	Orge germé	62-100	10^2-10^4
Viandes	Viande crue	2-34	10^1-10^3
	Viande cuite	22	10^1-10^3
Divers	Plats asiatiques	83	10^3-10^5
	Pâtes	50	10^4

Au sein des biofilms, les spores de *B. cereus* étant très hydrophobes, elles adhèrent aux surfaces de même nature ce qui permet une résistance accrue aux désinfectants tels que l'hypochlorite de sodium ou les ammoniums quaternaires (Faille *et al.*, 2002). Cette survie sous forme de biofilms au sein des chaînes de production engendre de potentielles sources de contamination des aliments par *B. cereus* (Lindsay *et al.*, 2002)

Bibliographie - Section *Bacillus cereus*

- Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. 1994. A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* ; 121:31-34.
- Agata N, Ohta M, Yokoyama K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol* ; 73:23-27.
- Andersson A, Granum PE, Ronner U. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int J Food Microbiol* ; 39:93-99.
- Anonyme. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH) : numéros 50/2002, 23/2002, 15/2001, 41/1998, numéro spécial mars 1998, numéro spécial avril 1997, 21/1996, 52/1994.
- Arakawa *et al.* 2003. Ultramicroscopy., *in press*
- Beattie SH, Williams AG. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett Appl Microbiol* ; 28:221-225.
- Becker H, Schaller G, von Wiese W, Terplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int J Food Microbiol* ; 23:1-15.
- Choma C, Guinebretiere MH, Cariin F, Schmitt P, Velge P, Granum PE, Nguyen-The C. 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J Appl Microbiol* ; 88:617-25.
- Faille C, Jullien C, Fontaine F, Bellon-Fontaine MN, Slomianny C, Benezech T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces : role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol* ; 48(8):728-38
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 1999. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl Environ Microbiol* ; 65:1811-1812.
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett Appl Microbiol* ; 31:385-389.

- Gaviria Rivera AM, Granum PE, Priest FG. 2000. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett ; 190:51-155.
- Granum PE. 1997. *Bacillus cereus*. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers" (M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville, eds.), pp. 327-336. ASM Press, Washington DC.
- Granum PE, Baird-Parker TC. 2000. *Bacillus* species. In "The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume II" (B. M. Lund, A. C. Baird-Parker and G. W. Gould, eds.), pp. 1029-1039. Aspen Publishers, Gaithersburg.
- Granum PE, Brynestad S, Kramer JM. 1993. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. Int J Food Microbiol ; 17:269-279.
- Granum E, Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Letters ; 157:223-228
- Griffiths MW. 1990. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. J Food Prot ; 53:790-792.
- Guinebretière MH, Berge O, Normand P, Morris C, Carlin F, NguyenThe C. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. Appl Environ Microbiol ; 67:4520-4530.
- Guinebretière M-H, Broussolle V, Nguyen-the C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. J Clin Microbiol ; 40:3053-3056.
- Hägglblom MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. 2002. Quantitative Analysis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Produced under Various Conditions. Appl Environ Microbiol ; 68:2479-2483.
- ICMSF. 1996. Microorganisms in foods, vol 5, Microbiological specifications of food pathogens, Editions Blackie Academic, Londres, p 513.
- in't Veld PH, Ritmeester WS, Delfgou-van Asch EH, Dufrenne JB., Wemars K, Smit E, van Leusden F M. 2001. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. Int J Food Microbiol ; 64:63-70.
- Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Kasatiya S. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Lett Appl Microbiol ; 21:103-105.
- Kramer JM, Gilbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In "Foodborne bacterial pathogens" (M. P. Doyle, ed.), Vol. 31, pp. 21-70. Marcel Dekker, New York.
- Lindsay D, Brozel VS, Mostert JF, von Holy A. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. J Appl Microbiol ; 92(2):352-61
- Logan NA, Berkeley RCW. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. J Gen Microbiol ; 130:1871-1882.
- Lund T, DeBuyser ML, Granum PE. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol Microbiol ; 38:254-261.
- Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. 2003. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoïdes* differentiation using a PCR-RE technique. IJFM ; 81:249-254.
- MMWR June 27. 1986. *Bacillus cereus* – Maine. MMWR 35(25):408-10.
- MMWR March 18. 1994. Epidemiologic Notes and Reports *Bacillus cereus* Food Poisoning Associated with Fried Rice at Two Child Day Care Centers – Virginia, 1993. MMWR 43(10):177-8.
- Notermans S, Dufrenne J, Teunis P, Beumer R, Te Giffel M, Peeters Weem P. 1997. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. Food Microbiol ; 14:143-151.
- Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lynch JA, Yee AJ, Wang SL, Styliadis S, Farber JM. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. J Food Prot ; 60:954-960.
- Pirttijarvi TS, Andersson MA, Scoging AC, Salkinoja-Salonen MS. 1999. Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. Syst Appl Microbiol ; 22:133-44.
- Phelps RJ, McKillip JL. 2002. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. Appl Environ Microbiol ; 68:3147-3151.
- Raevuori M, Kiutamo T, Niskanen A. 1977. Comparative studies of *Bacillus cereus* strains isolated from various foods and food poisoning outbreaks. Acta Vet Scand ; 18:397-407.
- Rusul G, Yaacob NH. 1995. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. Int J Food Microbiol ; 25:131-139.

- Shinagawa K, Konuma H, Sekita H, Sugii S. 1995. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett ; 130:87-90.
- Sperber WH. 2001. Hazard identification : from a quantitative to a qualitative approche. Food Control ; 12(4):223-228
- Te Giffel MC, Beumer RP, Slaghuis BA, Rombouts FM. 1995. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Neth. Milk & Dairy J. ; 49:125-138.
- Te giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM. 1997. Isolation and characterisation of *B. cereus* from pasteurised milk in households refrigerators in the Netherlands. Int J Fod Microb ; 34:307-318
- Valero M, Fernandez PS, Salmeron MC. 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. Int J Food Microb ; 82:71-79.

EXPERTISE PAR FILIERE⁹

L'implication des microorganismes pathogènes pré-cités n'est pas équivalente selon les différentes filières alimentaires.

Les Salmonelles sont des zoonoses et concernent par conséquent principalement des denrées d'origine animale. En 2001 par exemple, 94% des cas à *Salmonella* Enteritidis dont l'aliment d'origine avait été identifié étaient liés à des produits d'origine animale, 79% étant liés à des œufs ou produits à base d'œufs (Haeghebaert *et al.* 2002). En ce qui concerne la filière "Produits de la pêche et coquillages", la présence de *Salmonella* dans le poisson est rare ; elle est essentiellement liée à des défauts d'hygiène et plus fréquente pour certaines origines géographiques. Le cas des coquillages est particulier puisque la présence de cet agent pathogène est directement liée à la qualité des eaux.

Staphylococcus aureus peut être d'origine animale ou humaine. Il peut donc être présent dans les aliments d'origine animale mais aussi dans les aliments manipulés par l'homme. En 2001, 60% des cas liés à un aliment identifié provenaient de produits d'origine animale (viandes, produits laitiers et produits de charcuterie) tandis que 35% provenaient de produits d'origine mixte (Haeghebaert *et al.* 2002). La problématique de *S. aureus* dans la filière des produits laitiers a été envisagée dans le cadre des « recommandations de l'Afssa du 3 juin 2002 relatives à la relation entre la présence de *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans le lait cru, les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâtes molles » jointes à cette saisine (Annexe). Pour la filière des "Produits de la pêche et coquillages", il n'y a pas de problématique spécifique de la filière pour ce microorganisme.

Pour la filière des produits de la pêche, parmi les 5 espèces bactériennes abordées, seul *Vibrio* mérite un développement particulier, qui figure dans l'avis, car ce microorganisme est principalement inféodé au milieu marin et au produits de la mer.

Clostridium perfringens est une bactérie dont les spores sont retrouvées fréquemment dans l'environnement et dans le tube digestif des animaux. En 2001, 60% des cas d'origine identifiée étaient liés à la viande, volailles et produits de charcuterie, 37% étant liés à des aliments mixtes (Haeghebaert *et al.* 2002). La problématique de *C. perfringens* ne concerne pas la filière des "Produits de la pêche et coquillages".

Bacillus cereus est une bactérie du sol, dont les spores peuvent être retrouvés tout au long de la chaîne de production des aliments. Comme cela a été décrit dans l'avis, les cas d'intoxication sont principalement reliés aux produits végétaux, produits laitiers et plats cuisinés (Kramer et Gilbert 1989). Concernant les produits de la pêche et les coquillages, seuls des produits cuits à basse température (charcuteries de poisson) pourraient permettre leur croissance. C'est pourquoi, *Bacillus cereus* n'est pas recherché dans la filière car il ne présente pas d'intérêt particulier pour ce type de produits

⁹ Cette expertise « par filière » a été réalisée par des experts de l'Afssa.

Toutefois, une part non négligeable des aliments à l'origine de cas de toxi-infections alimentaires ne sont pas identifiés. Il faut donc nuancer les conclusions que l'on peut tirer des données épidémiologiques relatives aux différentes filières. En outre, la survie des agents pathogènes dans l'environnement peut être suffisamment longue pour que des aliments « éloignés » du réservoir puissent être à l'origine de cas d'intoxication, si les pratiques de production des aliments le permettent. Par exemple, plusieurs cas de salmonelles ont été reliés à la consommation de fruits et légumes frais aux Etats-Unis (Nguyen-the et Carlin 2000). Ainsi, la relation entre un agent pathogène et une catégorie d'aliment n'est pas figée et peut évoluer avec les pratiques alimentaires.

Bibliographie

- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Bouvet, P., Gallay, A., Espié, E., Vaillant, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. Bull. Epidémiol. Hebdo., 2002, 249-253.
- Kramer, J. M., Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In "Foodborne bacterial pathogens" (M. P. Doyle, ed.), Vol. 31, pp. 21-70. Marcel Dekker, New York.
- Nguyen-the C., Carlin F., 2000 - Fresh and Processed vegetables. Dans : The microbiological safety of foods (eds B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould), Aspen Publisher Inc., Gaithersburg MD (620-684).

Tels sont les éléments que l'Afssa, après expertise des données les plus actualisées concernant *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Bacillus cereus*, est en mesure de fournir aux administrations dans le but d'apporter un éclairage scientifique au dossier relatif à la réflexion nationale sur la révision de l'arrêté ministériel du 21 décembre 1979 et à la refonte de la législation communautaire relative à l'hygiène des aliments et le contrôle des zoonoses.

Pour certaines questions, notamment celles relatives à l'établissement d'une relation dose-effet (dont l'objet est d'apporter des informations pertinentes sur le niveau de risque représenté par un agent pathogène pour le consommateur), les données actuellement disponibles ne permettent pas toujours d'apporter de réponse définitive. C'est la raison pour laquelle, l'Agence se propose de réactualiser régulièrement les données figurant dans cet avis à l'aune des publications qui nourrissent le débat scientifique concernant l'hygiène alimentaire.

Martin HIRSCH

Recommandations

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la relation entre la présence de *Staphylococcus aureus* et la production d'entérotoxines dans le lait cru, les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâte molle

Suite à des travaux préliminaires menés au sein du groupe « Microbiologie et évaluation du risque » du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France relatifs au manque de justification scientifique et à la pertinence des critères microbiologiques réglementaires auxquels doivent satisfaire le lait cru destiné à la consommation, les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâte molle lors de leur mise sur le marché et, plus précisément, la relation entre la présence de *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans le lait et les fromages, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, après consultation du Comité d'experts spécialisé « Microbiologie » réuni le 14 février 2001, émet l'avis suivant

Considérant en premier lieu les risques de toxi-infection liés à la consommation de lait ou de fromages contaminés par *Staphylococcus aureus*

Considérant que les toxi-infections alimentaires à staphylocoques sont exclusivement des intoxications à entérotoxines staphylococciques ;

Considérant que le nombre d'incidents dus aux entérotoxines staphylococciques est relativement faible (10,9 % des 3839 foyers de toxi-infections alimentaires collectives déclarés en France de 1988 à 1997¹), mais que *S. aureus* est l'agent bactérien le plus fréquemment mis en cause dans les toxi-infections alimentaires collectives à produits laitiers en France (25% des foyers liés aux produits laitiers), avec une prépondérance de cas dus à des fromages à technologie de type présure ;

Considérant que les souches animales produisent majoritairement de l'entérotoxine de type C (surtout pour les biotypes ovins / caprins) et plus rarement les toxines D et A et que les souches humaines produisent essentiellement le type A, mais aussi les types D, B et C ;

Considérant que parmi les douze types d'entérotoxines staphylococciques connus, cinq seulement sont recherchés (A à E) et que parmi ceux-ci, le type A prédomine dans les toxi-infections alimentaires à staphylocoques (≈75%), suivi des types D, C et B ;

Considérant que la production des entérotoxines A, D et E s'effectue durant la phase exponentielle de croissance du micro-organisme alors que celle des toxines B et C se situe en phase stationnaire et dépend des facteurs tels que l'activité de l'eau, la température et le pH ;

Considérant que, parmi les souches de *S. aureus*, les biotypes animaux prédominent dans le lait cru et les produits laitiers, que des souches humaines peuvent occasionnellement contaminer le lait et par voie de conséquence être aussi présentes dans les fromages ;

- Considérant que la majorité de ces souches sont entérotoxigènes : supérieur à 50% pour le biotype humain, 67 à 85% pour les biotypes caprins/ovins et 9 à 30% pour les souches bovines ;
- Considérant que la présence de *S. aureus* paraît inévitable dans le lait en raison des mammites fréquentes des ruminants et de leur éradication difficile, que néanmoins la qualité microbiologique du lait est un point critique à maîtriser ; considérant que le critère réglementaire actuel relatif à *S. aureus* pour le lait cru destiné à la consommation humaine indique une limite maximale, au delà de laquelle le produit est considéré non-conforme, de 500 ufc/ml² (unités formant colonie par ml) ;
- Considérant que les résultats des plans de surveillance des fromages au lait cru menés par la Direction générale de l'alimentation en 1995, 1996 et 1997 montrent un pourcentage élevé d'échantillons non conformes à la réglementation en *S. aureus*, notamment pour les pâtes pressées non cuites et les pâtes molles à croûte lavée, mais qu'un résultat non conforme n'est pas synonyme d'un produit impropre à la consommation (contenant des entérotoxines). En effet, sur près de 70 recherches d'entérotoxines effectuées dans le plan de surveillance de 1997, 6 se sont révélées positives, correspondant à 3 fromages frais, 2 fromages à pâte pressée non cuite et 1 fromage à pâte molle à croûte fleurie ; de même, l'ensemble des analyses réalisées au laboratoire central d'hygiène alimentaire (Afssa Paris), durant les années 1998/1999, dans le cadre de contrôles officiels ou d'autocontrôles, montre un très faible pourcentage de fromages non conformes à la réglementation, contaminés par les entérotoxines : sur 625 fromages non conformes en *S. aureus*, les entérotoxines ont été détectées dans 33 fromages dont 19 fromages à pâte molle de chèvre et brebis, 8 fromages frais de chèvre, 5 fromages à pâte pressée non cuite, 1 fromage à pâte molle à croûte fleurie et 1 fromage frais de vache ;

Considérant en deuxième lieu l'influence technologique sur l'évolution de *S. aureus*

- Considérant que la production d'entérotoxines dans les produits laitiers implique un niveau de contamination en *S. aureus* généralement supérieur à 10⁶ cfu/g ;
- Considérant que les conditions technologiques de fabrication des fromages sont normalement favorables à une multiplication de *S. aureus*, sans atteindre, la plupart du temps, les niveaux élevés nécessaires à la toxinogénèse, mais que l'étape la plus à risque dans la majorité des technologies fromagères se situe dans les premières 24 heures après l'emprésurage du lait et, d'une manière générale, dans les 48 premières heures ;
- Considérant que la toxinogénèse dans les produits laitiers est due principalement à une défaillance des ferments lactiques et à une acidification insuffisante du caillé ;
- Considérant que la population en *S. aureus* durant l'affinage des produits laitiers varie selon le type de technologie :
- la population en *S. aureus* peut diminuer fortement lors de l'affinage de certains types de fromages, notamment ceux à coagulation lactique dominante pouvant amener à une conformité au critère *S. aureus* en sortie d'atelier, sans pour cela que l'innocuité de ces produits soit assurée,
 - la population en *S. aureus* peut diminuer lentement, voire être stationnaire, lors de l'affinage de fromages à coagulation présure dominante et se traduire par une non conformité au critère microbiologique en sortie d'atelier alors que la présence d'entérotoxines est rarement démontrée ;
- Considérant que les critères actuels (en cours de révision) relatifs à *S. aureus* pour les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâte molle au lait traité

² Directive 92/46/EEC

thermiquement indiquent une limite maximale respectivement de 10000 et 1000 cfu/g¹ ;

Considérant que les entérotoxines staphylococciques sont connues pour leur stabilité mais que leur devenir au cours de l'affinage des produits laitiers riches en enzymes reste à évaluer ;

Considérant que la détection de toxines dans les fromages repose sur des méthodes immunologiques permettant de détecter 5 sérotypes de toxines (A à E) ; considérant qu'une concentration préalable de toxines par extraction puis dialyse est obligatoire dans le cadre de contrôles officiels de recherche d'entérotoxines staphylococciques mais que des difficultés analytiques dues à des interférences conduisant à des faux positifs, propres aux méthodes immunochimiques, ont été mises en évidence (des développements dans ce domaine sont en cours pour lever ces problèmes d'interférence) ; considérant de plus qu'il n'existe pas de méthode actuellement validée par l'Association française de normalisation.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que le dénombrement de *S. aureus* à la sortie de l'atelier, dans les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâte molle pour leur mise sur le marché, ne permet pas une maîtrise optimale du risque associé à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques.

par conséquent, l'Afssa recommande, notamment dans le cadre de la révision des critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires :

- de maintenir le critère microbiologique pour le lait cru destiné à la consommation ;
- de dénombrer *S. aureus*, dans les fromages au lait cru et au lait thermisé et les fromages à pâte molle à l'étape la plus à risque selon la technologie propre des produits, c'est à dire dans les 48 premières heures à partir du début de la fabrication et d'élever la limite maximale du critère de *S. aureus* de 2 puissances de 10, quelle que soit la technologie de ces produits ;
- de rechercher des entérotoxines staphylococciques dans les cas de dépassement de la limite maximale lors du dénombrement de *S. aureus* à l'étape la plus à risque des produits.

Martin HIRSCH