

COMMUNICATION

Diagnostic et contrôle en médecine humaine des toxi-infections alimentaires collectives

KEY-WORDS : TOXI-INFECTIIONS ALIMENTAIRES. DIAGNOSTIC. BACTÉRIES. VIRUS.

Diagnosis and control of human food poisoning outbreaks

KEY-WORDS (Index medicus): FOODBORNE DISEASES. BACTERIA. VIRUS.

L'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

François DENIS *

RÉSUMÉ

Les laboratoires de microbiologie médicale jouent un rôle très important dans la détection des agents pathogènes impliqués dans les TIACs. Un certain nombre d'espèces bactériennes (Salmonella, Escherichia coli, Campylobacter, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens...) occupent toujours une place importante dans leur étiologie, mais le rôle des virus longtemps sous-estimé, notamment des Norovirus, apparaît très sous-estimé. Le diagnostic microbiologique classique reposant sur la culture s'est vu complété voire remplacé par la biologie moléculaire directement appliquée au matériel biologique. Les nouveaux outils devraient permettre de diminuer la proportion de TIACs d'étiologie suspectée ou indéterminée et d'augmenter l'exhaustivité des déclarations.

SUMMARY

Medical microbiology laboratories play a key role in the investigation of foodborne disease outbreaks. Bacterial pathogens (Salmonella, Escherichia coli, Campylobacter, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, etc.) have historically been implicated in foodborne illness, while the role of viruses (especially Norovirus) appears to have been underestimated.

Culture-based diagnosis has gradually been complemented, or replaced, by rapid molecular methods applied directly to biological samples. These new tools should help to reduce the number of outbreaks in which the etiological agent goes unidentified, and to improve the exhaustiveness of notifications.

* Département de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Dupuytren, 2 Av. Martin Luther King — 87042 Limoges ; e-mail : francois.denis@unilim.fr

Tirés à part : Professeur François DENIS, même adresse

Article reçu le 19 novembre 2012

INTRODUCTION

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIACs) à déclaration obligatoire sont très sous-estimées et ne représentent qu'une petite partie des toxi-infections alimentaires (TIA).

Cette sous estimation tient, certes, à une sous déclaration, mais aussi d'une part à un défaut de sensibilisation du corps médical et du public et d'autre part au manque d'information (voire de compétence spécifique) du biologiste médical auquel les échantillons sont adressés (selles essentiellement), sans qu'il lui soit précisé la notion de TIA ou de TIAC ou de l'aliment suspect.

Compte tenu de la diversité des agents pathogènes susceptibles d'être en cause et de la difficulté rencontrée pour identifier les responsables, le taux de toxi-infections dont l'étiologie reste indéterminée ou seulement suspectée reste très élevé.

Les outils de la microbiologie médicale moderne doivent permettre de réduire significativement les délais de réponse et le taux d'étiologies incertaines ainsi qu'une meilleure déclaration.

LE SPECTRE DES AGENTS PATHOGÈNES IMPLIQUÉS EST TRÈS LARGE

Ainsi, on retrouve des bactéries, des virus et des parasites [1], sans être exhaustif, on peut citer pour :

- les bactéries (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* entérovirulents, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* et *perfringens*, voire *Listeria monocytogenes*) ;
- les virus essentiellement les Norovirus, mais aussi les entérovirus, les astrovirus, etc ;
- les parasites soit classiques (*Cryptosporidium*, *Entamoeba*, *Giardia*), soit émergents.

La place principale revient aux bactéries, les virus n'étant en 2011 impliqués que dans 5 % des foyers et 15,9 % des cas de TIAC, le rôle des parasites restant mineur.

LES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES

En dehors des prélèvements touchant les aliments, les eaux qui relèvent du domaine vétérinaire, les laboratoires de microbiologie médicale recherchent les agents pathogènes essentiellement dans les selles, plus rarement dans les liquides de ponction (hémocultures, liquides céphalorachidiens) ou les vomissements chez les patients.

Pour l'entourage, ce sont surtout les selles qui sont examinées, alors que pour les employés du secteur alimentaire, le matériel biologique peut être plus varié (nez, gorge, peau en plus des selles).

Des prélèvements de sérums peuvent être utiles à la recherche de toxines (botulisme) ou d'anticorps dans un contexte de syndrome hémolytique urémique (SHU) ou d'hépatites A et E notamment.

LE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DOIT ÊTRE ORIENTÉ

Si certaines bactéries sont recherchées systématiquement dans les selles (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, certains *Escherichia coli*), les autres agents pathogènes font l'objet d'une recherche spécifique en fonction de la notion d'épidémie de TIACs, de l'aliment suspecté et également en fonction des symptômes (fièvre, diarrhée, vomissements), de l'aspect des selles cholériformes (*Vibrio*) ou hémorragiques (*E. coli* d'un syndrome hémolytique urémique, *Clostridium*). La notion de période d'incubation permet également une orientation ; schématiquement une incubation courte (1-6 voire 12 heures) sans fièvre faisant évoquer un processus toxigène (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*) et une incubation plus longue (16-72 heures) avec fièvre un processus invasif (*Salmonella*, *Campylobacter*).

RECHERCHE BACTERIOLOGIQUE [2]

La culture des selles reste la référence, l'agent responsable peut être obtenu par ensemencement de milieux standard et par celui de milieux spécifiques « orientés » à la recherche de *Vibrio* ou d'*E. coli* notamment responsables de syndrome hémolytique urémique (SHU) sur milieux d'enrichissement, puis sélectifs.

Dans un contexte présumé de TIAC, on a recours à des milieux particuliers en aérobiose pour *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, milieux parfois chromogènes et en anaérobiose avec une bactériologie quantitative pour numérer les spores de *C. perfringens* (significative si $> 10^6/g$).

Quand on suspecte des TIACs, on ne peut se contenter d'isoler chez les différents cas la même espèce bactérienne, car il est indispensable de poursuivre les investigations : sérotypes, clonalité et recherche du mécanisme physiopathologique avec recherche et caractérisation d'entérotoxines notamment chez les *E. coli* et les *S. aureus*. Le plus souvent, ces investigations complémentaires au-delà du diagnostic d'espèce relèvent non plus des laboratoires de routine mais des centres nationaux de référence (CNR).

De plus en plus, on tend à développer des techniques permettant par recherche directe sur les échantillons biologiques (selles essentiellement), sans culture du diagnostic d'espèce voire de la toxine en cause à l'aide de techniques immunoenzymatiques ou génomiques par amplification génique (*polymerase chain reaction*, PCR ou PCR en « temps réel ») (Figure 1).

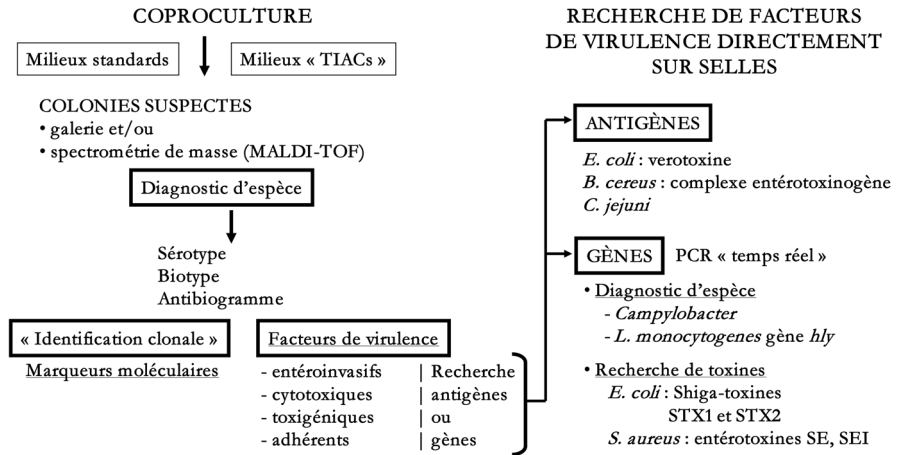


FIG. 1. — Démarche diagnostique à partir des selles

TABLEAU 1. — Les TIACs en France en 2011 (source InVS)

AGENTS	FOYERS		CAS	
	Nb	%	Nb	%
CONFIRMÉS	218	19	2 562	26
SUSPECTÉS	665	58	5 606	58
INDÉTERMINÉS	270	23	1 506	16
TOTAL	1 150	100	9 674	100

Les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les TIACs en partant des données 2011 de l’InVS (non publiées) apparaissent être les suivantes.

Les salmonelles sont à l’origine de 41 % des foyers de TIAC et de 22,9 % des cas avec une place dominante occupée par *Salmonella* Typhimurium 25,8 % et *S. Enteritidis* 22,5 %, les *Salmonella* indéterminées étant à l’origine de 48,3 % des foyers de salmonelloses.

À noter l’émergence de *S. Typhimurium* atypiques, monophasiques (ayant perdu leur phase flagellaire 1, 2) [3, 4].

Les *Campylobacter* sont responsables de 14 % des foyers et de 5 % des cas avec une nette dominance de *C. jejuni* à l’origine de 80 % des cas impliquant ce genre bactérien [5].

Les *Staphylococcus aureus* sont retrouvés dans 6 % des foyers et 21 % des cas, les *Bacillus cereus* impliqués dans 10 % des cas et 12 % des foyers et *Clostridium perfringens* dans 10 % des cas et près de 19 % des foyers [3].

À noter que si les *Escherichia coli* occupent une très faible place, ils n'en sont pas moins préoccupants du fait de la difficulté du diagnostic bactériologique car parmi les *E. coli* constituant la flore normale des selles, il est nécessaire de détecter les souches entérohémorragiques (EHEC typiques et atypiques), entérotoxigènes (ETEC) productrices de toxines shigatoxines ou stx (STEC) ou eae (AEEC), etc.

Ceci nécessite soit l'isolement des souches d'*E. coli*, la détermination du sérotype et la détection de toxines ; soit la recherche directe sur les selles le plus souvent après enrichissement des gènes codant stx ou eae [3, 6].

Les centres nationaux de référence confirment les diagnostics d'espèce ou de sérotypes, comparent les souches provenant des différents malades afin de vérifier l'identité des souches, leur clonalité, recherchent les supports génétiques de virulence et étudient la sensibilité des souches aux antibiotiques. Ainsi, on note chez les *Salmonella* l'accroissement des souches porteuses de betalactamases à large spectre (BLSE) et pour *Salmonella* et *Campylobacter* une forte progression des résistances aux fluoroquinolones, notamment à la ciprofloxacine [3, 4, 5].

RECHERCHE VIROLOGIQUE

La place des virus dans l'étiologie des TIACs ne cesse de progresser. Durant des décennies, on ne disposait que de la microscopie électronique et des cultures pour isoler et identifier les virus en cause, entérovirus, adénovirus et plus difficilement rotavirus.

La détection d'antigènes spécifiques et de génomes a complètement transformé le diagnostic.

Ainsi, le groupe des virus apparentés aux *Caliciviridae*, les Norovirus, qui restent non cultivables, apparaissent nettement dominants [6, 7]. Leur émergence n'est qu'apparente et liée essentiellement aux progrès technologiques.

Ainsi, dans les TIACs aux États-Unis [6], ces Norovirus ont vu leur incidence croître considérablement de 1,5 % puis 42 % pour atteindre 96 % selon que l'on a utilisé pour le diagnostic seulement la microscopie électronique, puis la recherche d'antigènes pour arriver à l'amplification génique par rt-PCR puisqu'il s'agit de virus à ARN.

En France, dans les TIACs dues aux coquillages, les Norovirus sont à l'origine de 31 % des foyers.

Comme pour les bactéries, les virus même non cultivables peuvent être typés et comparés entre eux. Sont impliqués au sein des Norovirus le génogroupe II (humain et porcin) dans 90 % des épidémies humaines et le génogroupe I dans l'environnement et les aliments ; au sein de ces génogroupes, on peut même étudier la clonalité des souches [8].

La démarche du diagnostic virologique est de mieux en mieux codifiée [6, 8] (Figure 2).

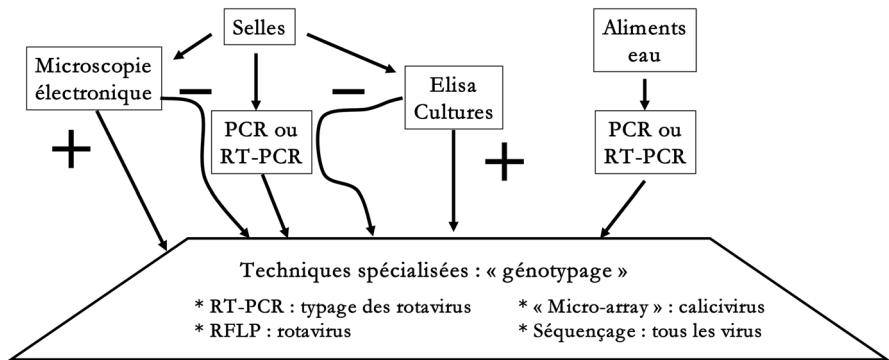


FIG. 2. — Démarche diagnostique virologique au cours d'une épidémie de gastro-entérite d'origine hydrique ou alimentaire, d'après [8]

LE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DOIT PROGRESSER

Si on fait le bilan des TIACs en France en 2011 (Tableau I), sur 1 150 foyers, les étiologies ne sont confirmées que pour 19 % d'entre eux, de même que dans 26 % des 9 674 cas. Le taux d'hospitalisation n'est pas négligeable puisque 7,2 % des patients sont concernés et les hospitalisés sont souvent mieux explorés que les autres malades.

Les suspicions concernent 58 % des foyers et des cas et les étiologies indéterminées près de 20 % des foyers et des cas.

Il reste donc bien des progrès à faire dans le diagnostic et la déclaration de ces toxi-infections.

CONTRÔLE ET EXHAUSTIVITÉ DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES

Pour améliorer le contrôle des TIACs, outre le renforcement de la prévention de la contamination initiale et de la maîtrise des agents pathogènes dans la filière alimentaire qui relève du domaine vétérinaire, il importe d'agir sur une étape essentielle à savoir la reconnaissance et le report des cas d'intoxications alimentaires.

Ceci suppose une implication de toute la chaîne de prise en charge, cliniciens et biologistes doivent être sensibilisés aux TIACs, mais il est évident que devant un cas apparemment « isolé », il est difficile de faire la part entre une toxi-infection et une gastroentérite communautaire. Ils doivent impérativement disposer d'informations dès qu'un cas est suspecté avec des précisions sur la nature de l'aliment suspect (à titre d'exemple du riz doit faire rechercher *B. cereus*, des coquillages des *Vibrio* ou des Norovirus, etc.), ainsi que sur les symptômes (délai d'incubation, type de diarrhée, suspicion de syndrome hémolytique urémique) afin que le biologiste puisse mettre en œuvre lui-même les recherches adéquates ou bien effectuer les

prélèvements, stocker et acheminer les échantillons biologiques destinés au Centre national de référence compétent. De plus, tout chef de laboratoire d'analyses et de biologie médicale est tenu au même titre que tout docteur en médecine de notifier le cas.

CONCLUSION

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIACs) ou non (TIAs) sont de mieux en mieux prises en compte, des progrès doivent être réalisés en intégrant les techniques microbiologiques modernes dans la démarche recherchant les agents pathogènes afin de diminuer le taux de foyers ou de cas dont l'étiologie est suspectée ou indéterminée et en améliorant l'exhaustivité des déclarations.

Enfin, les TIAs-TIACs sont le prototype des contextes dans lesquels les informations et les investigations doivent être partagées et harmonisées avec une parfaite coordination multidisciplinaire (épidémiologie/microbiologie humaine — animale et aliments). De plus, la prise en charge doit être « syndromique » avec fonctionnement en un réseau efficace d'une dizaine de Centre nationaux de référence différents au niveau national.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DE VALK H., VAILLANT V., DESENCLOS J.C. — Infection d'origine alimentaire. In *Traité de Santé publique*, François Bourdillon, Gilles Brücker, Didier Tabuteau, *Médecine-Sciences*, Flammarion. Edit. Paris 2001, 288-292.
- [2] DENIS F., PLOY M.C., MARTIN C., BINGEN E., QUENTIN R. — Bactériologie médicale (Elsevier Masson Edit.) 2° Ed. Paris 2011, 631 p.
- [3] BARON S., BENREKASSA J., CALAVAS D. *et al.* — Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale surveillance et évaluation. *Bull. Epidemiol. Hebd.*, Numéro thématique 9 mai 2012/Hors-série 51 p.
- [4] WEILL PX., LE HELLO S. — Rapport d'activité 2011. Centre National de référence des *Salmonella*.
- [5] MEGRAUD F. — Rapport d'activité 2011. Centre National de référence des *Campylobacter*.
- [6] KOOPMANS M., VENNEMA H., HEERSMA H. *et al.* — Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg. Inf. Dis.*, 2003, 9, 1136-1142.
- [7] POTHIER P. — Les virus des gastroentérites en France et en Europe 2012. *Bull. Acad. Natl. Méd.*, 2010, 194, 1427-1438.
- [8] POTHIER P., GARBARG-CHENON A., KOHLI E. — Stratégie du diagnostic d'une gastroentérite aiguë. In *Les gastroentérites virales* coordinateurs Jean Cohen, Antoine Garbarg-Chenon, Pierre Pothier (Elsevier Edit. Coll. Option Bio), 2002, 305-310.

DISCUSSION

M. Bernard SALLE

Comment se fait la transmission du staphylocoque doré ? Chaîne alimentaire ou contamination humaine ?

J'ai peu parlé de *Staphylococcus aureus* dans les TIACs alors que cette espèce est en cause dans 6 % des foyers et à l'origine de 20,9 % des cas. La contamination est d'origine humaine, l'aliment étant souillé du fait d'un portage asymptomatique (arbre respiratoire, selles, mains sales) ou de lésions cutanées staphylococciques. Pour confirmer l'étiologie, il ne suffit pas de trouver la bactérie dans l'aliment ou dans les selles des patients, il faut vérifier la présence du gène codant l'entérotoxine staphylococcique sur souche ou directement sur selles. À titre indicatif en 2010 en France sur 2 027 cas de TIACs à *S. aureus*, la distribution des cas étaient respectivement de 970 cas en milieu scolaire, 361 cas dans un contexte familial, 214 cas liés à une restauration commerciale, les autres étant retrouvés dans des instituts médicaux sociaux, des prisons ou consécutifs à des banquets.

M. Christian NEZELOF

J'ai été surpris de n'avoir pas entendu parler de la barrière germicide de l'estomac, qui peut-être « contournée » par la chaleur (extrinsèque et intrinsèque), le lait (effet tampon) et la trop grande quantité de liquide ingéré (épisode estival), d'où les épidémies de « turista ».

L'estomac constitue bien une barrière du fait notamment de l'acidité gastrique. Cet obstacle peut être franchi chez les jeunes enfants, chez les patients prenant des antiulcéreux ou des pansements gastriques ou des aliments ayant un effet tampon. Si l'inoculum est important, les bactéries présentes dans l'aliment ont plus de chance de se retrouver viables dans l'intestin. Mais certaines toxines telles les entérotoxines de *S. aureus* ou botuliques sont résistantes aux sucs, et certaines entérotoxines staphylococciques résistent à la chaleur et peuvent donc provoquer des symptômes, même s'il n'y a pas de bactéries viables détectables.

M. Jacques BATTIN

À l'époque, les gastro-entérites à colibacilles pathogènes de certains sérotypes étaient si fréquentes qu'elles suscitaient des épidémies de crèche, des maladies nosocomiales, génératrices de déshydratations. Celles-ci ont suscité des protocoles de réhydratation, utilisés dans le monde entier, qui ont modifié le pronostic de ces affections. Le statut actuel de ces affections a-t-il été modifié dans les services de pédiatrie ?

Les épidémies de gastroentérites infantiles (GEI) ont constitué pendant des décennies la hantise des hospitaliers jusque dans les années 1960-1970, on incriminait des *Escherichia coli* entéropathogènes (ECEP). Certains hôpitaux pratiquaient même un tri sélectif parmi les nourrissons entrants par immunofluorescence réalisée directement sur les selles pour hospitaliser séparément les enfants porteurs d'*E. coli* appartenant à certains sérotypes O :55, O :111, O :125, etc. Ces épidémies sont devenues rares dans les pays

industrialisés, elles persisteraient dans les pays en voie de développement. Toutefois le rôle de ces ECEP est actuellement discuté, le sérotype n'est pas un marqueur de virulence, certaines souches sont susceptibles de permettre un attachement ou un attachement/effacement au niveau des entérocytes et/ou de produire une entérotoxine. Les descriptions de ces épidémies seraient à revoir car, d'une part les souches de collection du fait de repiquages ont souvent perdu du matériel génétique portant ces facteurs de virulence et d'autre part, on méconnaissait les principales causes de gastroentérites sévissant dans ces tranches d'âge tels que rotavirus ou norovirus.

M. Léon LE MINOR

Si dans les pays à hygiène développée il y a un Centre national des salmonella, il existe aussi un Centre international des salmonella dépendant de l'OMS. Depuis les années 1960 celui-ci est à l'Institut Pasteur de Paris.

Les souches de salmonelles sont adressées au Centre National de Référence (CNR) qui se situe à l'Institut Pasteur, centre dirigé durant de nombreuses années par le Professeur Léon Le Minor et actuellement par François-Xavier Weill, la surveillance est essentielle mais très lourde puisque sur la période 2005-2010, elle a porté sur près de 60 000 souches. Ce CNR travaille bien sur en liaison avec le Centre international des Salmonella de l'OMS.

M. Bernard CHARPENTIER

Revenant aux épisodes de syndrome hémolytique et urémiques (SHU) en Allemagne et à Bordeaux, on est frappé par la qualité du travail fait par les bactériologistes sur le plan de la génétique moléculaire des bactéries, mais on reste sur notre faim sur l'origine en amont des E. coli. Comment un E. coli d'origine « bovine intestinale » se retrouve-t-il sur des graines ou des végétaux en amont de la toxi-infection ?

Les souches O104 d'*Escherichia coli* producteur de Shigatoxine (STEC) responsables de syndromes hémolytiques urémiques (SHU) retrouvées en Aquitaine et en Allemagne en mai-juin 2011 appartenaient au même clone. L'origine retrouvée était l'ingestion de graines de fenugrec issues de culture biologique et dont l'origine semble commune liée à une production en Égypte ; mais on ne peut affirmer que ce clone a une origine « bovine ».

M. Pierre GODEAU

À côté du problème qualitatif n'y a-t-il pas un problème quantitatif, pour affirmer la responsabilité d'un agent pathogène isolé lors d'un prélèvement ?

L'aspect quantitatif avec la détermination de doses minimales infectantes (DMI) dans les aliments doit être prise en compte car selon les genres ou espèces, elles sont très variables allant de moins de dix bactéries par gramme pour *Escherichia coli* O157 ou *Shigella* sp, à 10^5 - 10^6 pour *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ou *Bacillus cereus*. Quant à l'aspect quantitatif dans les produits pathologiques, il n'a été évoqué que pour les *Clostridium perfringens* pour lesquels on considère comme pathologiques seulement les taux de spores supérieurs à 10^6 /g de selles. On peut quantifier dans le sérum la toxine

botulique. Selon les espèces, on peut considérer que l'isolement d'une seule colonie de *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhi ou de *Shigella* spp est pathologique, alors que pour d'autres sérotypes de *Salmonella*, des *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*, la seule présence ne suffit pas pour avoir une présomption étiologique, des recherches complémentaires : facteurs de virulence, entérotoxines sont nécessaires. Mais la nature et la quantité d'agent infectieux ne font pas tout, le terrain intervient. Il existe en effet des susceptibilités génétiques ; ainsi, 20 % des sujets ingérant des Norovirus ne sont pas malades car ils ne possèdent pas certains antigènes de groupes sanguins qui jouent un rôle de récepteurs viraux au niveau des entérocytes.