

Investigation d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à *Bacillus cereus* producteurs d'entérotoxines

Sabrina Cadel Six (1) (sabrina.cadelsix@anses.fr), Sabine Herbin (1), Marie Léone Vignaud (1), Raphaël Chretien (1), Sabine Messio (1), Sylvie Pairaud (1), Line Prigent (2), Jacques-Antoine Hennekinne (1), Anne Brisabois (1)

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Département Contaminants microbiologiques des aliments, Maisons-Alfort, France;

(2) Direction départementale de la protection des populations des Côtes-d'Armor, Ploufragan, France.

Résumé

En juin 2012, une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à *Bacillus cereus* a été déclarée dans une crèche à Guingamp, en Bretagne (département des Côtes d'Armor). Les repas consommés par les enfants ont été analysés et *Bacillus cereus* a été identifié comme le seul agent pathogène présent. Des purées de carotte et brocolis et de la compote d'abricot, associées à des mauvaises pratiques de préparation, ont été à la source de la contamination. Onze isolats provenant des différents aliments ont été caractérisés phénotypiquement et génétiquement. Les isolats étaient hautement producteurs d'entérotoxine non hémolytique (NHE) et ont été classés dans le groupe phylogénétique III de *B. cereus sensu lato*.

Mots-clés

Bacillus cereus, toxi-infection alimentaire, entérotoxines, caractérisation phénotypique et génotypique

Abstract

A food poisoning outbreak investigation due to enterotoxin producing *Bacillus cereus*

In June 2012, a food poisoning outbreak caused by *Bacillus cereus* was reported in a children's day care facility in Brittany, France. The meals consumed by the children were analysed and *Bacillus cereus* was the only pathogen identified. Contaminated broccoli and carrot purees, apricot compote and poor cooking practices were found to be the cause of the outbreak. Eleven isolates from the different foods were phenotypically and genetically characterised. The isolates produced large quantities of non-hemolytic enterotoxin (NHE) and were attributed to the phylogenetic group III of *Bacillus cereus sensu lato*.

Keywords

Bacillus cereus, food poisoning outbreak, enterotoxins, phenotypic and genotypic characterization

Bacillus Cereus (*B. cereus*), bactérie sporulée, peut être à l'origine de deux types d'infections d'origine alimentaire chez l'Homme, généralement bénignes. Toutefois, des cas plus graves voire même mortels ont été décrits, dont deux en France (De Buyser *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2000). Le premier type d'infection, dont les symptômes sont principalement des diarrhées, survient entre huit et seize heures après l'ingestion de cellules végétatives ou de spores de *B. cereus* présentes dans l'aliment. Ces diarrhées sont suivies d'une production d'entérotoxines dans l'intestin grêle de l'hôte (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Même si dans de rares cas des temps d'incubation plus longs ont été observés, la durée totale de la maladie est normalement de douze à vingt-quatre heures, avec une moyenne de vingt heures (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les signes cliniques et leur délai d'apparition peuvent être facilement confondus avec ceux liés à une toxi-infection à *Clostridium perfringens*. Les trois toxines retrouvées chez les isolats à l'origine des maladies diarrhéiques sont l'hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non hémolytique (NHE) et la cytotoxine K (cytK) (Logan, 2012). Le second type d'infection, plus grave, est caractérisé par des signes cliniques émétiques (nausées, vomissements) survenant une à six heures après ingestion de l'aliment contaminé. Cette symptomatologie est causée par l'ingestion d'une toxine, le céréulide (ces), préformée dans l'aliment lors de la croissance de *B. cereus*. Ce peptide très stable, codé par le gène *ces*, n'est inactivé ni par les procédés agro-alimentaires classiques ni par son passage dans le tractus digestif de l'Homme (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les signes cliniques et le délai d'apparition dus à l'ingestion du céréulide sont très proches de ceux provoqués par les entérotoxines staphylococciques.

Parmi les agents pathogènes à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) bactériennes en France depuis 2006, *B. cereus* se place en troisième position par ordre de fréquence. En 2012, cet agent pathogène a été mis en cause dans 218 foyers de TIAC, dont 9 % de foyers confirmés bactériologiquement, représentant 17 % des cas suspects (InVS). En France, un foyer confirmé à *B. cereus* se définit d'une part, par l'isolement de l'agent dans l'échantillon alimentaire suspecté, d'autre part, la concordance des données cliniques (signes cliniques, durée d'incubation) et épidémiologiques qui suggèrent une infection due à cet agent pathogène (Vaillant *et al.*, 2004). À l'inverse,

lorsque l'agent pathogène n'est pas isolé, la suspicion est basée sur un algorithme d'orientation étiologique qui tient compte des signes cliniques, de la durée médiane d'incubation et du (des) type(s) d'aliments consommés.

Cette étude présente l'investigation d'une toxi-infection alimentaire collective à *B. cereus* survenue dans une crèche à Guingamp. L'étude menée repose sur une approche originale d'analyse qui combine les données épidémiologiques et les résultats obtenus avec plusieurs marqueurs phénotypiques et génotypiques.

Matériel et Méthodes

Données épidémiologiques

Toutes les données épidémiologiques (nombre de cas, signes cliniques, aliments suspectés) ont été recueillies au cours d'entretiens ou grâce à des questionnaires réalisés par l'autorité sanitaire locale (Tableau 1). La traçabilité des aliments suspectés a été réalisée par la direction départementale de la protection des populations (DDPP) des Côtes-d'Armor. Les aliments consommés par les enfants ont été recueillis et sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 1. Données épidémiologiques recueillies pour les huit cas

Nombre de cas	Âge des patients (mois)	Symptômes	Temps d'incubation (h)	Aliments suspects
3	3 à 18	Vomissements et diarrhée	16 h	Compote d'abricot
4	18 à 36	Vomissements et diarrhée	16 h	Compote d'abricot, purée de brocoli, purée de carotte, différents types de viande
1*	36	Vomissements	< 5 h	Compote d'abricot, purée de brocoli, purée de carotte, différents types de viande

*hospitalisation

Tableau 2. Échantillons soumis aux analyses de la flore aérobique mésophile, des coliformes thermo-tolérants, des staphylocoques à coagulase positive et des *Bacillus cereus* présomptifs. Tous les aliments avaient été conservés à 3°C, les prélèvements ont été réalisés le 18 juin 2012

Aliment	Date de préparation	Flore aérobique mésophile (cfu/g)	Coliformes thermotolérants à 44°C (cfu/g)	Staphylocoques coagulase positive (cfu/g)	<i>Bacillus cereus</i> présomptifs (cfu/g)
Blanc de poulet	14/06/2012	2.70E+08	< 10	< 10	< 100
Filet mignon	14/06/2012	< 30000	< 10	< 10	< 100
Bœuf	14/06/2012	< 30000	< 10	< 10	< 100
Carottes à la crème fraîche	14/06/2012	< 30000	< 10	< 10	< 100
Compote d'abricots	13/06/2012	< 30000	n.r.	< 10	700
Purée de brocolis	13/06/2012	< 30000	n.r.	< 10	3800
Purée de carottes	14/06/2012	< 30000	n.r.	< 10	100

Tableau 3. Résultats de la caractérisation phénotypique et génotypique de onze isolats de *Bacillus cereus*

Isolats	Caractérisation phénotypique					Caractérisation génotypique				Attribution phylogénique ^a
	Activité Lécithinase	Activité Hémolytique	Hydrolyse de l'amidon	Production de NHE (1 to 5) ^b	Production de HBL	ces	cytK1 cytK2	hlyII	cspA	panC
12CEB01BAC à 12CEB11BAC	+	+/-	-	5	-	-	-	-	-	Groupe III

a: selon Guinebretière *et al.*, 2008

b: score croissant de production de NHE

Dénombrement et isolement

Les échantillons prélevés ont été soumis à la recherche des bactéries aérobies mésophiles, des coliformes à 44°C, des staphylocoques à coagulase positive et de *B. cereus* présomptifs en appliquant, respectivement, les normes NF V08-051 (1999) et NF V08-100, la NF V 08 - 060, la NF EN ISO 6888-2 à 37 °C et la NF EN ISO 7932 à 30 °C. A la suite de ces analyses, onze isolats de *B. cereus*, cinq isolés de la compote d'abricot, cinq de la purée de brocoli et un de la purée de carotte, ont été envoyés au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses pour leurs caractérisations phénotypique et génotypique (12CEB01BAC à 12CEB11BAC).

Caractérisation des souches bactériennes

Comme précédemment décrit (Cadel-Six *et al.*, 2012), la caractérisation phénotypique comprend l'aspect des colonies sur milieu de Mossel, l'hémolyse, le test d'hydrolyse de l'amidon et la production de deux entérotoxines diarrhéiques l'NHE et l'HBL. La caractérisation génotypique s'appuie sur la recherche par PCR des gènes de virulence *cytK1/cytK2* et *ces*, du gène *cspA*, marqueur de psychrotrophie comme précédemment décrit (Cadel-Six *et al.*, 2012). Le gène de virulence *hlyII* (impliqué dans la synthèse de l'hémolysine II) (Tran *et al.*, 2011) a également été recherché. Les isolats ont été classés dans les groupes phylogénétiques décrits par Guinebretière en 2008 sur la base du séquençage du gène *panC* (Guinebretière *et al.*, 2008).

Résultats

Informations épidémiologiques

Le 15 juin 2012, une TIAC avec des signes cliniques gastro-intestinaux (vomissements et diarrhées) a été rapportée à la DDPP du département des Côtes d'Armor. Cette toxi-infection est survenue dans une crèche de Guingamp. Sur un total de vingt-quatre enfants, huit d'entre eux (33 %), âgés de trois à trente-six mois ont présentés après la consommation du repas du midi du 14 juin 2012, des signes cliniques tels que des nausées, des vomissements et/ou des crampes abdominales. L'un de ces enfants âgé de trente-six mois a présenté des signes cliniques immédiatement après la sieste qui succédait le repas de midi, alors que les symptômes des sept autres enfants se sont développés au domicile dans la soirée ou pendant la nuit du 14 juin. L'enfant ayant réagi le plus rapidement a dû être hospitalisé pendant plusieurs jours pour déshydratation.

Pour l'ensemble des malades, les signes cliniques sont apparus entre cinq à seize heures après la consommation du repas. Les données épidémiologiques et les aliments soupçonnés sont récapitulés dans le [Tableau 1](#). L'enquête épidémiologique suggérait la compote d'abricot comme étant la cause commune de l'infection car il s'agissait du seul aliment consommé par tous les cas.

Dénombrement, isolation et caractérisation des isolats de *Bacillus cereus*

Les résultats du dénombrement de chaque échantillon sont présentés dans le [Tableau 2](#). Parmi les bactéries pathogènes recherchées, seul *B. cereus* a été détecté. Sur l'ensemble des produits alimentaires consommés, *B. cereus* a été isolé dans la compote d'abricot, la purée de brocoli et la purée de carotte. Le nombre de bactéries viables était relativement faible, respectivement 700, 3 800 et 100 cfu/g.

L'analyse des résultats obtenus avec les différents marqueurs a montré que les onze isolats partageaient le même profil phénotypique et génotypique ([Tableau 3](#)). La totalité des isolats présentait une activité lécithinase positive, et une activité hémolytique faible et était caractérisé par une forte production d'entérotoxine NHE. Les quatre gènes de virulence testés (*ces*, *cytK1*, *cytK2* et *hlyII*) et le marqueur de psychrotrophie (*cspA*) n'ont pas été détectés. D'après la classification de Guinebretière (Guinebretière *et al.*, 2008), les isolats appartenait tous au groupe phylogénique III de *B. cereus sensu lato*.

Discussion

En accord avec la DGAL, le Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses collecte depuis 2006, au niveau national, des isolats de *B. cereus* suspectés d'être impliqués dans des TIAC et retransmis par les laboratoires d'analyses agréés. Les isolats collectés sont systématiquement caractérisés phénotypiquement et génotypiquement et les renseignements épidémiologiques sont rassemblés dans l'objectif de construire une base de données, de faciliter l'investigation et d'identifier la variabilité des souches au sein de l'espèce *B. cereus*.

Dans cette étude, les analyses réalisées ont montré que *B. cereus* était l'agent responsable de la toxi-infection collective survenu à Guingamp. Parmi les huit enfants, seulement un seul, hospitalisé, a présenté des signes cliniques émétiques après une période d'incubation

Tableau 4. TIAC précédemment analysées et TIAC dans lesquelles les isolats présentent le même profil que celui identifié dans la présente étude

Numéro de la souche	Année	Aliment	Cellules/g	Nombre de cas	Lieu	Symptômes	Temps d'incubation	Autre agents pathogènes isolés dans le même échantillon
08CEB105BAC	2008	Pâte	745 000	4 cas/12	Restaurant	Diarrhée et maux d'estomac	1 h	<i>Staphylococcus</i> (mais SEA-SEE non détectés)
08CEB106BAC								
08CEB115BAC	2008	Salade de riz	> 10 000 000	15 cas/56	Repas familial	Vomissements	1 h	<i>Staphylococcus</i>
09CEB23BAC	2009	Bœuf hachée	1 900	7 cas/65	Maison de retraite	Vomissements et diarrhée	3 - 10 h	0
09CEB24BAC								
09CEB41BAC	2009	Ragoût de bœuf	6 400	11 cas/80	Maison de retraite	Vomissements et diarrhée sanglante	n.r.	<i>Clostridium perfringens</i>
10CEB68BAC*	2010	Purée de légumes	12 000	19 cas/143	Cantine d'un centre de rééducation physique et mental	Vomissements et diarrhée	n.r.	0
10CEB73BAC*	2010	Purée de pommes de terre						
10CEB79BAC	2010	Salade de riz	72 000 000	20 cas/n.r.	Repas familial	Vomissements et diarrhée	1 - 3 h	n.r.
12CEB01BAC à 12CEB11BAC	2012	Compote d'abricot, purée de brocolis, purée de carottes	100 à 3 800	8 cas/24	Crèche	Vomissements et diarrhée	5 - 16 h	0

n.r.: non renseigné.

*(Cadel-Six et al., 2012)

de cinq heures. Les sept autres ont présenté des signes cliniques émétiques aussi bien que diarrhéiques et des temps d'incubation plus longs. Les données cliniques (signes cliniques, durée d'incubation) et épidémiologiques suggéraient donc plutôt une infection due à *B. cereus* de type diarrhéique producteur d'entérotoxine. Les analyses phénotypiques et génotypiques des isolats ont confirmé cette hypothèse.

Les onze isolats, qu'ils proviennent de la compote d'abricot, de la purée de brocoli ou de la purée de carotte, partageaient exactement le même profil phénotypique et génétique. Ils ont montré une activité hémolytique faible sur l'agar Colombia, aucune production d'hémolysine BL et l'absence du gène codant l'hémolysine II. De plus, le gène codant le céréulide n'était pas présent. Les isolats ont présenté une forte production d'entérotoxine diarrhéique non-hémolytique (NHE) (score de 5 sur une échelle de 1 à 5).

Bien qu'un seul profil phénotypique et génotypique ait été identifié, nous ne pouvons pas cependant exclure l'hypothèse de la présence de plusieurs souches différentes de *Bacillus* contaminant les repas. En effet, les symptômes et les temps d'incubation observés pour l'enfant de trente-six mois, hospitalisé, pouvaient être en faveur d'une infection due à une souche de type émétique. Cependant, l'absence d'isolement de souches cliniques ne permet pas de confirmer l'hypothèse de la présence de telles souches de type émétique. Les sept autres enfants ont manifesté des réactions plus tardives et moins graves. Nous avons déjà souligné précédemment (Cadel-Six et al., 2012) l'intérêt qu'il y aurait à rechercher les souches cliniques pour confirmer les TIAC étudiées. D'autre part, nous pourrions aussi expliquer les variations des signes cliniques et périodes d'incubation par une différence de sensibilité individuelle, par l'âge des enfants ou encore par la quantité d'aliments (c'est-à-dire le nombre de bactéries) ingérée.

Tous les isolats ont été classés dans le groupe phylogénique III (Guinebretiere et al., 2008). Dans la littérature le groupe III est décrit comme un groupe rassemblant des souches de *B. cereus* mésotrophique, fortement virulentes et productrices de spores très résistantes. De nombreuses souches appartenant au groupe III ont été précédemment liées à des toxi-infections alimentaires (Claus and Berkeley, 1986; Guinebretiere et al., 2008).

En raison de l'absence du gène *cpsA*, les isolats analysés dans cette toxi-infection alimentaire étaient certainement mésophiles avec des températures de croissance s'étendant de 15 à 45 °C. Le processus de préparation de la purée et de la compote d'abricot a probablement

joué un rôle important dans la sélection et la prolifération des souches de *B. cereus* mésophiles appartenant au groupe III. Les valeurs particulièrement hautes de la flore aérobie mésophile identifiées dans les échantillons (Tableau 2) renforcent l'hypothèse que des pratiques d'hygiène insuffisantes, ainsi que des conditions de stockage inadéquates, ont été probablement responsables de la contamination croisée entre les aliments.

Le profil des onze isolats observé dans cette étude avait été précédemment identifié dans notre laboratoire (Cadel-Six et al., 2012). Ces souches provenaient principalement de féculents, de viandes, de légumes ou de plats contenant de la viande, des pommes de terre et des légumes. Ce profil est peu fréquent au sein de notre collection (environ 5 %, soit 20 souches sur 429) et les renseignements épidémiologiques concernant ces souches sont hétérogènes et parfois non disponibles. La période d'incubation, quand elle est rapportée, peut être courte (de 1 à 10 heures) et les signes cliniques divers : maux d'estomac et diarrhée, vomissements seuls, vomissements avec des diarrhées et vomissements avec des diarrhées sanglantes (Tableau 4). Ces infections sont caractérisées par un nombre élevé de cellules par gramme d'aliment (72 000 000, > 10 000 000 et 745 000 cfu/g) dans le cas des repas servis au restaurant ou à l'issue de fêtes familiales (Tableau 4). Quand la charge infectieuse est moins importante (entre 1 900 et 12 000 cfu/g) les personnes atteintes sont soit très jeunes, soit âgées, ou encore immunodéprimées (pensionnaires de crèches, maisons de retraite ou de centre hospitalier). Ces caractéristiques correspondent à celles de l'étude présentée avec des charges infectieuses comprises entre 700 et 3 800 cfu/g d'aliment, des signes cliniques et des temps d'incubation variables. L'investigation conduite a donc permis de caractériser plus précisément la TIAC à *B. cereus* survenue à Guingamp. La comparaison du profil obtenu avec ceux recensés dans la base de données du laboratoire a permis de mettre en évidence l'existence d'un groupe de souches de *B. cereus* appartenant au groupe III provoquant une symptomatologie diarrhéique et émétique, et capables de provoquer une infection même avec de faibles doses.

Conclusion

L'étude menée repose sur une approche qui combine les données épidémiologiques et les résultats obtenus avec plusieurs marqueurs phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques. Elle souligne l'intérêt et l'intérêt d'isoler les souches cliniques lors de TIAC, afin de comparer leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques aux souches

issues des aliments. Notre étude souligne aussi l'utilité de créer une base de données rassemblant les informations épidémiologiques avec les résultats de caractérisation des souches. Cette base de données permettant le suivi et la comparaison de souches dans le cadre d'investigation de TIAC notamment, permet également de dégager des tendances évolutives spatio-temporelles de cet agent pathogène et pourrait évoluer selon le format de la base de données Anses ACTEOLAB déjà en place pour *Salmonella* (Lailier *et al.*, 2014). Cette étude montre une fois de plus que des mauvaises pratiques d'hygiène et de stockage peuvent constituer un réel danger, en particulier pour des populations sensibles (Claus and Berkeley, 1986; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Laboratoire de développement et d'analyse de Ploufragan pour les analyses réalisées dans les aliments et la transmission des isolats et la direction départementale pour la protection des populations des Côtes-d'Armor pour la transmission des données épidémiologiques.

Références bibliographiques

Cadel-Six, S., de Buyser, M.L., Vignaud, M.-L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekine, J.A., Pihier, N., Brisabois, A., 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010 Bull. Epid. Santé Anim. Alim. 50, 57-61.

Claus, D., Berkeley, R.C.W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL, In: Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M., Holt, J. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1105-1139.

De Buyser, M., Guinebretière, M., Aujames, M., Schiaulini, M., Langlois, R., Galita, C., Pariente Khayat, A., Dao, T., Messio, S., Gagnier, S., Guignard, A., 2008. Investigation d'une TIAC en maison de retraite: un cocktail de *Bacillus cereus*. *Bulletin épidémiologique Afssa-DGAL* 27-28, 6-9.

Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* 10, 851-865.

InVS. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives - Données de la déclaration obligatoire, 2012. In *Données Tiac 2012*

Lailier, R., Berta-Vanrullen, I., Aleaxandre, L.-Z., 2014. ACTEOLab-*Salmonella*: plus qu'une base de données du réseau *Salmonella* français, un outil au service de la surveillance des salmonelles d'origine non humaine. *Euroreference* 12, 21-23.

Logan, N.A., 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* 112, 417-429.

Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38, 254-261.

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32, 579-606.

Tran, S.L., Guillemet, E., Ngo-Camus, M., Clybouw, C., Puhar, A., Moris, A., Gohar, M., Lereclus, D., Ramarao, N., 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol* 13, 92-108.

Vaillant, V., de Valk, H., Baron, E. 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France (InVS). http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire/inf_origine_alimentaire.pdf.