

mais aussi tous les acteurs de la chaîne de transformation des aliments « de la fourche à la fourchette » ainsi que les deux laboratoires de référence, CNR et LNR, spécialisés dans la caractérisation des isolats. La confrontation des données de caractérisation moléculaire avec celles concernant l'origine et le contexte d'isolement contribue pleinement à l'épidémiologie des souches. Ces données permettent d'identifier très rapidement la présence de cas humains groupés reliés éventuellement à un aliment contaminé et de prendre les mesures nécessaires pour éviter la survenue d'une épidémie. Ce système unique est reconnu par ses performances en termes de réactivité et de détection de cas de listériose. Il existe donc une exhaustivité des déclarations des cas humains et de la transmission des souches cliniques associées. En revanche, la surveillance des aliments positifs en *L.m* et l'envoi des souches au CNR ou au LNR n'est pas exhaustive car seule la déclaration des aliments contaminés dans le cadre d'une alerte produit est obligatoire. L'obtention d'une cartographie des souches alimentaires françaises permettrait d'améliorer l'identification de l'origine de cas sporadiques humains, et pourrait être utile pour identifier rapidement un produit non répertorié à risque pouvant être la source d'une épidémie, comme ce fut le cas aux États-Unis en 2011 dans l'épidémie liée à la contamination de cantaloups.

L'ensemble des dispositifs, en particulier, les plans de surveillance réalisés au cours de ces dernières années, montrent que certains produits peuvent représenter un danger pour le consommateur notamment ceux consommés en l'état, permettant la croissance de *L.m* et conservés un certain temps à basse température. De plus, compte tenu de son caractère ubiquiste, cette bactérie est très largement répandue dans le milieu extérieur, ce qui peut engendrer des contaminations à partir de l'environnement de l'atelier (plans de travail, matériel). Si elle contamine un aliment qui permet sa croissance, il existe alors un risque potentiel pour le consommateur. C'est pourquoi, une classification des aliments selon le risque a été élaborée précédemment par l'Afssa (devenue Anses) [12]. Parmi les mesures établies pour assurer un niveau élevé de protection des consommateurs, la réglementation européenne EC 178/2002 indique que l'exploitant agro-alimentaire doit notifier toute denrée alimentaire non-conforme aux prescriptions de sécurité sanitaire et mettre en œuvre des mesures de retrait et/ou rappel. Le règlement EC 2073/2005 modifié a établi des critères de sécurité pour *L.m* pour certaines catégories de produits. En complément des ces actions de plan de maîtrise, les mesures de gestion des aliments liés aux alertes-produits ont pu contribuer à l'absence d'épidémie à *L.m* en France depuis 2006. Il apparaît donc important de maintenir une vigilance sur toute la chaîne de production, d'impliquer tous les acteurs, de sensibiliser la population, en particulier les populations à risque et d'identifier l'évolution des modes de préparation pouvant présenter un risque pour le consommateur.

#### Remerciements

Les auteurs remercient tous les laboratoires publics et privés qui participent à la transmission des souches de *Listeria monocytogenes* et des informations épidémiologiques s'y rapportant, ainsi que tous les acteurs de terrain.

#### Références

- [1] Le Monnier A, Leclercq A. *Listeria* and listeriosis: from farm to fork. *Pathol Biol.* 2009;57(1):17-22.
- [2] Schlech WF 3<sup>rd</sup>, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N Engl J Med.* 1993;308 :203-6.
- [3] Brisabois A. *Listeria monocytogenes*: une bactérie sous haute surveillance. *Bulletin de l'AAEIP (Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur).* 2008;50(195):71-7.
- [4] Goulet V, Leclercq A, Vaillant V, Le Monnier A, Laurent E, Thierry-Bled F, et al. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull Epidemiol Hebd.* 2008;(30-31):268-72.
- [5] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3819-22.
- [6] Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Methods.* 2010;80(2):134-7.
- [7] Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol.* 2001;65(1-2):55-62.
- [8] Martin P, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, De Valk H; Participants in the PulseNet Europe Feasibility Study. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3:303-8.
- [9] Kérouanton A, Marault M, Dao TT, Brisabois A. Bilan de la caractérisation des souches isolées dans le cadre du plan de surveillance 2006-contamination par *Listeria monocytogenes* des préparations de viandes. *Bulletin Épidémiologique Afssa-DGAL.* 2008;(23-24):10-1.
- [10] Roussel S, Guiliani L, Dao TT, Vignaud ML, Grout J, Félix B, et al. Bilan de la caractérisation moléculaire des souches de *Listeria monocytogenes* isolées de merguez et de charcuterie dans le cadre des plans de contrôles mis en place par la Direction générale de l'alimentation en 2008 et en 2009. *Bulletin Épidémiologique Afssa-DGAL.* 2010;(37):7-11.
- [11] Chaussade H, Garot D, Bastides F, De Gialluly C, Mercier E, Gras G, et al. A Touraine cluster of central nervous system listeriosis. *Med Mal Infect.* 2011;41(11):613-6.
- [12] Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Avis sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance. Avis du 9 mars 2005. Afssa: Maisons-Alfort; 2005. 21 p. Disponible à : <http://www.afssa.fr/Documents/MIC2003sa0362.pdf>

## Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010

Sabrina Cadel Six (sabrina.cadelsix@anses.fr)<sup>1</sup>, Marie-Laure De Buysier<sup>1</sup>, Marie-Léone Vignaud<sup>1</sup>, Trinh Tam Dao<sup>1</sup>, Sabine Messio<sup>2</sup>, Sylvie Pairaud<sup>2</sup>, Jacques-Antoine Hennekinne<sup>2</sup>, Nathalie Pihier<sup>3</sup>, Anne Brisabois<sup>1</sup>

1/ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, Unité Caractérisation et épidémiologie bactérienne, Maisons-Alfort, France

2/ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, Unité Caractérisation des toxines, Maisons-Alfort, France

3/ Direction générale de l'alimentation (DGAL), Mission des urgences sanitaires, Paris, France

### Résumé / Abstract

Devant le nombre croissant de toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) associées à *Bacillus cereus*, une caractérisation phénotypique et génotypique des isolats provenant d'aliments suspectés a été réalisée et analysée, en lien avec les signes cliniques des cas déclarés.

Entre 2006 et 2010, 55 foyers déclarés ont été enquêtés. La combinaison des différents marqueurs recherchés (hémolysine, amidon, production de toxines Nhe et Hbl, détection des gènes *ces*, *cspA*, *cyt K1* et *cyt K2*), a permis de classer les 279 isolats analysés en 19 profils différents. Certains de ces profils ont pu être associés à l'un des sept groupes phylogénétiques précédemment décrits chez *B. cereus sensu lato*. L'ensemble de ces résultats a confirmé i) le potentiel diarrhéique ou émétique de la plupart des

### *Bacillus cereus* food poisoning outbreaks: strain characterization results, 2006-2010

With the growing number of foodborne outbreaks associated with *Bacillus cereus*, a phenotypic and genotypic characterization of isolates from suspected food, in relation to clinical signs of reported cases, was implemented and analysed.

Between 2006 and 2010, 55 reported outbreaks were investigated. The combination of several markers (hemolysin, starch, production of Hbl and Nhe toxins, detection of *ces*, *cspA*, *cyt K1* and *cyt K2* genes), allowed to classify the 279 isolates tested into 19 different profiles. Some of these profiles

souches, ii) l'implication des groupes III et IV, V ou II dans les foyers de Tiac alors que les souches du groupe VI ne semblent pas pathogènes, iii) l'émergence de souches du groupe VII particulièrement virulentes.

Cette étude souligne l'intérêt de la caractérisation des souches en lien avec les informations épidémiologiques disponibles, afin d'améliorer la surveillance des Tiac à *Bacillus cereus*.

could be associated with one of the seven phylogenetic groups described within *B. cereus sensu lato*. All these results confirmed i) the diarrheal or emetic potential of most strains ii) the involvement of groups III and IV, V or II in foodborne outbreaks while strains of group VI do not seem to be pathogen, iii) the emergence of strains of group VII particularly virulent.

This study stresses the importance of monitoring the outbreaks potentially associated with *Bacillus cereus*, and of comparing results of strain characterization with epidemiological and clinical information.

## Mots clés / Key words

*Bacillus cereus*, toxi-infections alimentaires, souches, caractérisation / *Bacillus cereus*, foodborne diseases, strain characterization

## Contexte

### *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* est une bactérie sporulée, aéro-anaérobie facultative et thermo-résistante ; les températures de croissance de cette bactérie peuvent varier de 5 à 50°C. Ces caractéristiques lui confèrent une résistance particulière à l'action de bactéricides, aux désinfectants, aux radiations, à la dessiccation et au cycle du froid. Sept groupes génétiques ont été définis chez *Bacillus cereus sensu lato* sur la base du séquençage du gène *panC* (pantoate-β-alanine ligase C). Les sept groupes reflètent les différentes aptitudes des souches à se développer à différentes températures, à la thermorésistance de leurs spores et à la fréquence de leur implication dans les toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) (tableau 1) [1-3]. *Bacillus cereus* peut produire deux types de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et résistante à une large gamme de températures et de pH, et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétales ou de spores en quantité suffisante.

Le syndrome émétique est caractérisé par des nausées, des vomissements et des crampes abdominales se produisant 1 à 5 h après l'ingestion des aliments contaminés, avec rétablissement dans les 6 à 24 h. Les symptômes associés sont semblables à ceux générés par les entérotoxines staphylococciques, protéines préformées par *Staphylococcus aureus* dans les aliments. Ce type d'intoxication alimentaire est relié à la production d'un dodécadécapeptide cyclique, le céréulide, et nécessite l'ingestion de ce dernier. Le syndrome diarrhéique est attribué à des entérotoxines : l'hémolysine BL (Hbl) complexe à trois composants (Hbl B, Hbl L1 et Hbl L2), l'hémolysine Nhe elle aussi composée de trois sous-unités (NheA, NheB et Nhe C) et la cyto-toxine K (CytK) [4;5]. Ces toxines sont produites dans le tube digestif de l'hôte et, pour être actives, les deux premières doivent être composées de leurs différentes sous-unités. Les temps d'incubation après ingestion des plats contaminés varient de 6 à 15 h avec rétablissement dans les 24 à 48 h. Ce type de toxi-infection alimentaire peut facilement être confondu avec celle provoquée par *Clostridium perfringens*.

### Système de surveillance

Les toxi-infections alimentaires doivent obligatoirement être déclarées lorsqu'elles sont collectives. Ces toxi-infections alimentaires sont souvent bénignes et celles associées à *Bacillus cereus* peuvent être confondues avec celles provoquées respectivement par *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. De ce fait, les Tiac à *Bacillus cereus* sont vraisemblablement sous-estimées. *Bacillus cereus* représentait entre 1996 et 2005 la 4<sup>e</sup> cause de Tiac en France (après *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*) avec 1 766 cas répartis sur 94 foyers confirmés et le taux de décès une augmentation du nombre de Tiac à *Bacillus cereus*, avec environ 10 Tiac entre

2000 et 2002, et environ 25 Tiac en 2003. Entre 2006 et 2010, *Bacillus cereus* représente selon les années la 4<sup>e</sup> à la 6<sup>e</sup> cause des foyers de Tiac en France pour lesquels l'agent est confirmé (1 156 cas répartis sur 62 foyers) et la 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> cause des foyers pour lesquels l'agent est suspecté (3 058 cas répartis sur 286 foyers) (communication personnelle DGAL). On parle de foyer confirmé lorsque l'agent est isolé dans des restes alimentaires ou des repas témoins et de foyer suspecté lorsque l'agent pathogène n'a pas été confirmé ; il est alors suspecté à l'aide d'un algorithme d'orientation étiologique prenant en compte les signes cliniques, la durée médiane d'incubation et le type d'aliments consommés.

En 2006, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) a émis une Lettre d'ordre de service (n°0719 du 24/07/06) demandant aux Directions départementales des services vétérinaires (DDSV) (intégrées depuis dans les Directions départementales de la protection des populations) d'envoyer, pour caractérisation, les souches de *Bacillus cereus* isolées des aliments suspectés d'être à l'origine de Tiac à l'Unité Caractérisation et épidémiologie bactérienne de l'Anses, dans le cadre d'un projet de recherche visant à estimer le risque d'émergence de *Bacillus cereus* en fonction de l'évolution des procédés de transformation des aliments dans la filière agro-alimentaire [7]. Ainsi, une étude de caractérisation a pu être menée sur les souches de *Bacillus cereus* isolées des aliments et transmises par les laboratoires départementaux d'analyse vétérinaires et alimentaires. Ces souches étaient accompagnées d'une fiche de renseignements portant sur l'origine de la souche (nature de l'aliment, conditionnement, département, etc.) et les signes cliniques observés chez les malades. L'objectif de cet article est de tracer un bilan sur la caractérisation des isolats de *Bacillus cereus* associés à 55 foyers non reliés épidémiologiquement. L'originalité de ce travail porte sur la recherche de plusieurs caractères comprenant des marqueurs de virulence, non réalisée jusque-là dans les investigations de Tiac. Actuellement, l'investigation de foyers de Tiac à *Bacillus cereus* porte uniquement sur la recherche de *Bacillus cereus* dans l'aliment susceptible d'être à l'origine du foyer. Aucune souche clinique n'est habituellement isolée.

## Matériel et méthodes

### Données épidémiologiques

Les souches étaient accompagnées de renseignements transmis par les DDPP. Différents types d'informations ont été recensées, relatives d'une part à la souche isolée de l'aliment (nombre de *Bacillus cereus*/g, présence/absence d'autres pathogènes, nature de l'aliment, lieu de préparation et conditionnement de l'aliment, département d'isolement de la souche), et d'autre part relatives au foyer identifié (nombre de malades, signes cliniques, délais d'incubation, lieu et département de survenue). Cependant dans certains cas, les informations épidémiologiques étaient incomplètes ou manquantes.

### Souches bactériennes

Durant la période d'étude, 304 isolats de *Bacillus cereus* correspondant à 60 foyers identifiés ont été reçus à l'Anses et caractérisés ; cependant, l'étude présentée ici ne portera que sur 279 isolats correspondant à 55 foyers pour lesquels un lien a pu être établi entre les données épidémiologiques cliniques indiquées sur la fiche de renseignement et les caractéristiques microbiologiques des souches.

### Méthodes de caractérisation de *Bacillus cereus*

#### Caractérisation phénotypique

Elle comprend l'aspect des colonies sur milieu de Mossel, l'hémolyse, le test d'hydrolyse de l'amidon [8]; la production de deux entérotoxines

Tableau 1. Caractéristiques des 7 groupes génétiques chez *Bacillus cereus sensu lato* ([1]) / Table 1. Characteristics of the 7 genetic groups within *Bacillus cereus sensu lato* ([1])

Groupes	Températures de croissance (°C)	Thermorésistance	Association avec des Tiac
I	10-43	Non renseigné	-
VI	5-37	+/-	-
II	7-40	++	+
V	10-40	++	+
IV	10-45	++	++
III	15-45	+++	+++
VII	20-50	+++	+++

**Tableau 2** Bilan des foyers à *Bacillus cereus* analysés de 2006 à 2010 à l'Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, France / **Table 2** Review of outbreaks associated with *Bacillus cereus* analyzed from 2006 to 2010 in the ANSES Laboratory for Food Safety in Maisons-Alfort, France

Année	Nombre de foyers de Tiac	Signes cliniques décrits par les personnes ayant consommé les aliments analysés			Nombre d'isolats de <i>Bacillus cereus</i> testés (isolés d'aliments suspects)
		Diarrhée	Syndrome émétique	Non renseigné	
2006	2	1	1	0	11
2007	7	4	2	1	39
2008	22	8	5	9	99
2009	11	2	3	6	43
2010	13	5	5	3	87
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>279</b>

diarrhéiques après 6 h de culture en bouillon cœur-cerveille à 37°C : NHE (kit Elisa de chez 3M™ Tecra™, France) et HBL (kit *Bacillus cereus* ET-RPLA de chez Oxoid, Thermo Scientific, France).

#### Caractérisation génotypique

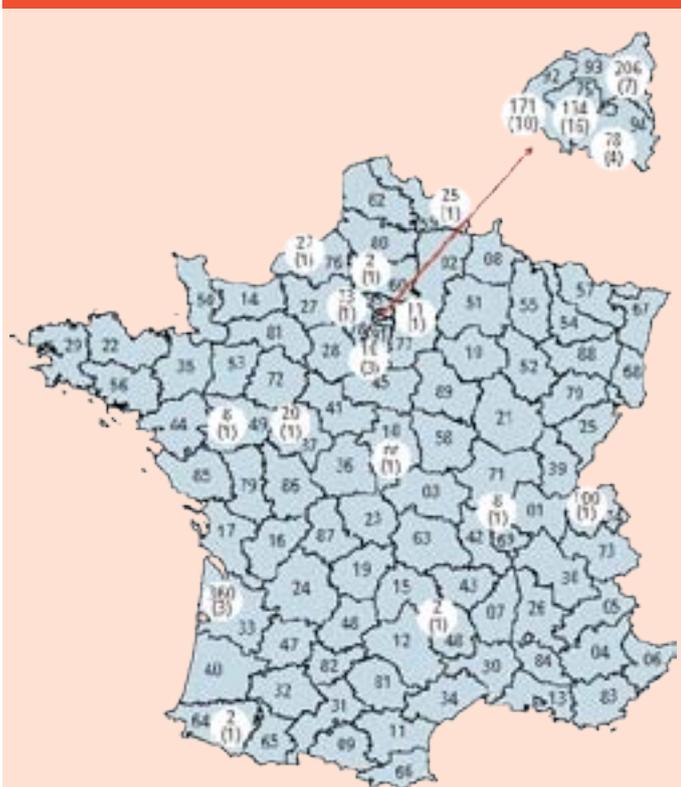
Elle s'appuie sur la recherche par PCR des gènes de virulence *cytK1/cytK2* (les deux formes de la cytotoxine K[5]) et *ces* (impliqué dans la synthèse de la toxine émétique [9]) et du gène *cspA*, marqueur de psychrotrophie [10].

### Résultats

#### Principales caractéristiques épidémiologiques

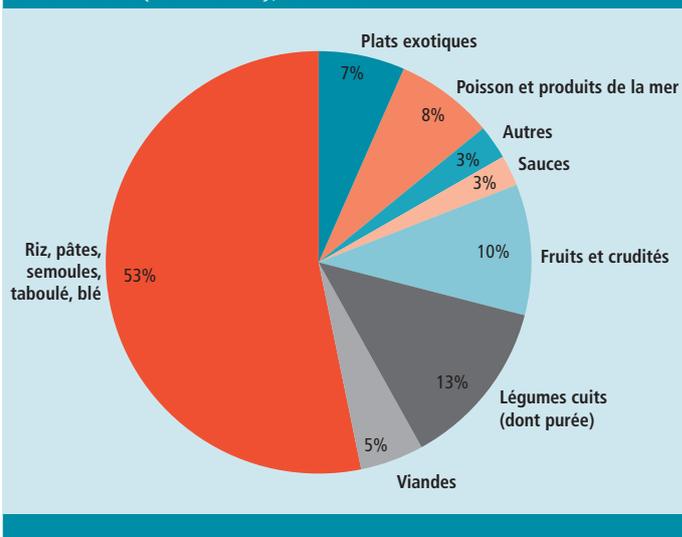
Au total, 60 foyers ont été analysés sur la période 2006 à 2010. Cependant, cet article traitera uniquement des 55 foyers (279 isolats) pour lesquels une concordance possible a été relevée. Selon les informations souvent imprécises qui nous sont parvenues concernant les symptômes, 20 des 55 foyers étaient plutôt de type diarrhéique, 16 foyers plutôt de type émétique et 19 foyers non renseignés clairement. Le délai d'incubation n'était pas précisé dans un tiers des foyers (tableau 2).

**Figure 1** Répartition géographique des cas déclarés dans 55 foyers de Tiac à *Bacillus cereus* rapportés en France de 2006 à 2010 / **Figure 1** Geographical distribution of the cases reported in 55 foodborne outbreaks associated with *Bacillus cereus* in France from 2006 to 2010



nr = non renseigné. (n°) = le chiffre entre parenthèses correspond au nombre de foyers. Corse : pas de données.

**Figure 2** Aliment responsable ou suspecté dans les Tiac à *Bacillus cereus* analysées entre 2006 et 2010 (55 foyers) en France / **Figure 2** Food suspected in the foodborne outbreaks associated with *Bacillus cereus* between 2006 and 2010 (55 outbreaks), in France



#### Répartition géographique et nombre de cas

Le nombre des cas n'est pas renseigné pour 2 foyers (1 à Paris et 1 dans le Cher) sur 55. Les 53 foyers renseignés représentent 1237 cas. Quarante-deux foyers sont survenus en région Île-de-France et 13 dans sept autres régions. Dix-huit départements français ont été touchés. Au total, 360 cas sont survenus dans le département de la Gironde (33) (répartis en 3 foyers), 206 cas en Seine-Saint-Denis (93) (7 foyers), 171 cas dans les Hauts-de-Seine (92) (10 foyers), 134 cas à Paris (75) (16 foyers) et 100 cas en Haute-Savoie (74) (1 foyer). Les cas déclarés dans les autres départements varient entre 2 et 78 répartis en 1 ou 4 foyers (figure 1). La fréquence plus élevée des foyers en Île-de-France peut provenir du fait que les souches provenant de cette région ont été obtenues directement par l'intermédiaire de l'Unité LCSV (Laboratoire central des services vétérinaires) intégrée au Laboratoire de sécurité sanitaire des aliments de l'Anses.

#### Lieu de survenue

Soixante-sept pour cent (67%) des foyers sont survenus en restauration collective ou commerciale et 15% en milieu familial ; 14% des foyers étaient non renseignés. Les foyers en restauration collective ou commerciale ont été à l'origine de 87% des malades, dont 49% en milieu scolaire (602/1 237 cas), 15% en restauration commerciale (192/1 237 cas), 11% en restauration d'entreprise (143/1 237 cas), 10% dans des institutions médico-sociales (121/1 237 cas) et 2% dans d'autres collectivités (22/1 237 cas).

#### Aliment responsable ou suspecté

La figure 2 illustre la répartition des aliments responsables ou suspectés. Un aliment a été considéré comme responsable si une concordance a été mise en évidence entre les caractéristiques de la souche, les isolats analysés, et les signes cliniques décrits dans les feuilles de renseignement. Un aliment a été considéré comme suspect si la concordance est possible. La responsabilité confirmée ou suspectée des produits à base de féculents (salades de riz, pâtes, taboulé, semoule et blé) a été établie dans 53% des Tiac à *Bacillus cereus*. Le riz et les pâtes cuits, parfois conservés plusieurs jours à température ambiante avant consommation, ont été responsables de 5 Tiac familiales, dont une sévère (impliquant des souches du groupe III *ces*+). La toxine émétique de *Bacillus cereus*, probablement présente dans les aliments, semble être le facteur responsable de ces intoxications.

Les légumes cuits et la purée de pomme de terre ont été impliqués dans 13% des 55 foyers. Les purées reconstituées longtemps à l'avance dans les maisons de retraite et les hôpitaux ont été impliquées dans 3 Tiac et avaient déjà été impliquées dans deux Tiac survenues avant 2006, dont une mortelle [4]. Des plats exotiques (poulet tandoori, tajine, poisson au lait de coco, etc.) et des viandes ont été impliqués respectivement dans 7 et 5% des foyers. Les épices (du fait que la dessiccation n'a aucun effet sur les spores de *Bacillus cereus*), ainsi que le non respect de la chaîne du froid pourraient être les causes de ces contaminations.

**Tableau 3** Différents profils de souches de *Bacillus cereus* observés de 2006 à 2010 à l'Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, France / **Table 3** Different profiles of *Bacillus cereus* strains observed from 2006-2010 by the ANSES Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France

Profil n°	Hémolyse	Amidon	Indice NHE	Titre HBL	Gène ces	Gènes cytK	Gène cspA	Groupe génétique déduit	Nombre de souches par profil
1	+	+ ou -	<4	< 1/32	-	-	+	VI	2
2	+ ou -	-	5	-	+	-	-	III ces+	14
3	+ ou -	-	4 à 5	-	-	-	-	III	13
4	+ ou -	- ou +	4 à 5	-	-	cytK2+	-	III cytK2+	10
5	- ou +	-	1 à 2	-	-	cytK1+	-	VII	5
6	+	+	4 à 5	> 1/32	-	-	-	IV, V ou II	5
7	+	+	<4	> 1/32	-	-	-	IV, V ou II	1
8	+	+	<4	- ou < 1/32	-	cytK2+	-	IV, V ou II	8
9	+ ou -	+	<4	> 1/32	-	cytK2+	+	IV, V, II ou VI	8
10	+	+ ou -	1 à 2	- ou < 1/32	-	-	-	IV, V ou II	7
11	-	-	1 à 2	-	-	cytK2+	-	IV, V ou I	1
12	++	-	3	-	-	cytK2+	-	IV, V ou II	1
13	+ ou -	+	2	< 1/32	-	cytK2+	-	IV, V ou II	4
14	+	+	2 à 3	-	-	-	-	IV, V ou II	4
15	-	-	1 à 2	-	-	-	-	?	1
16	-	-	2	> 1/32	-	-	-	?	1
17	+	-	4	> 1/32	+	-	-	III ces+	1
18	+	+	3 à 4	> 1/32	-	cytK2+	-	IV, V ou II	11
19	-	-	1	1/32	-	cytK2+	-	IV, V ou II	2

+ : détecté ; - : non détecté ; Indice NHE fort : 4 à 5, souches fortement productrices et donc présentant un potentiel de virulence avéré. Indice NHE faible à nul : 1 à 3, souche présentant un potentiel de virulence non avéré ; ? : pas de groupe génétique déduit.

## Caractérisation des souches de *Bacillus cereus*

### Identification des profils et potentiel de virulence associé

Selon les différentes combinaisons des caractères phénotypiques et génotypiques étudiés, les 279 isolats de *Bacillus cereus* se sont répartis en 19 profils distincts (tableau 3). Plusieurs isolats ont été analysés pour un même foyer et le dédoublement basé sur l'identité de profil de souche pour un même foyer a permis de sélectionner 99 souches non reliées épidémiologiquement se répartissant dans les 19 profils décrits. Certains profils permettent de classer les souches dans un groupe génétique dont le potentiel de virulence est connu. Le profil 2 présente le gène *ces*, attribué aux souches du sous-groupe émétique du groupe III. Les profils 3 et 4 sont attribués aussi au groupe III dont le potentiel de virulence est élevé (forte production de NHE, indice égal à 4 ou 5), pouvant être de type émétique ou diarrhéique. Le profil 5 porte la signature *cytK1*, attribué au groupe VII, un groupe peu fréquemment identifié, mais qui a déjà été associé à plusieurs Tiac de type diarrhéique dont la première décrite, survenue en France en 1998, a été mortelle [4]. Enfin, le profil 1 porte la signature *cspA* attribuée aux souches du groupe VI jusque-là non associées à des Tiac et considérées comme non pathogènes.

Les autres profils ne permettent pas une attribution à un seul groupe. Mais ceux qui présentent des caractères de virulence avérés (forte production de NHE et/ou de HBL) peuvent être impliqués dans des Tiac de type diarrhéique. Enfin, nous avons observé quelques profils inattendus (n°9) (gène *cspA*+) ou rares (n°11,12,16,17), ou ne comprenant aucun caractère de virulence connu (n°10,15).

Le gène *cytK2* est présent dans plusieurs profils. Cependant, la cytotoxine K2 étant considérée comme moins virulente que la cytotoxine K1, son incidence sur la pathogénicité des souches reste méconnue.

### Définition de trois catégories de foyers et identification des profils de *Bacillus cereus* associés

Il est possible de distinguer trois catégories : (1) les foyers où un seul profil de *Bacillus cereus* est retrouvé, en l'absence d'autres pathogènes ; (2) les

**Tableau 4** Foyers de Tiac attribués à un seul profil de *Bacillus cereus* de 2006 à 2010 à l'Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, France / **Table 4** Foodborne outbreaks classified in a single profile of *Bacillus cereus* from 2006-2010 by the ANSES Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France

Année	Localisation	Département	Nombre de cas	Aliment suspecté ou confirmé	Nombre de <i>B. cereus</i> /g	Profil n°	Groupe génétique potentiel
2006	Maison d'arrêt	93	40	Tagine	4x10 <sup>3</sup>	2	III ces+
2007	nr*	75	5	Semoule	1,2x10 <sup>7</sup>	2	III ces+
2008	Restaurant	75	4	Semoule et agneau	5,5x10 <sup>4</sup> et 1x10 <sup>3</sup>	2	III ces+
2008	Restaurant interentreprises	93	70	Salade de fruits	6,3x10 <sup>3</sup>	2	III ces+
2009	Familial	64	2	Riz cantonais	1,6x10 <sup>5</sup>	2	III ces+
2009	Restaurant	92	15	Sauce poulet	5x10 <sup>2</sup>	2	III ces+
2010	Familial	60	2	Gratin de pâtes	1,5x10 <sup>7</sup>	2	III ces+
2010	Familial	48	2	Bœuf cuit	>3x10 <sup>5</sup>	2	III ces+
2010	Familial	69	8	2 salades riz, et saucisse cuite	1,7x10 <sup>7</sup> , 5,4x10 <sup>5</sup> , 3x10 <sup>3</sup>	2	III ces+
2007	nr	59	25	Bœuf bourguignon	1x10 <sup>2</sup>	3	III ces-
2007	nr	75	12	Crevettes cuites	6,8x10 <sup>4</sup>	3	III ces-
2010	Hôpital	93	19	Purée légumes et purée pomme de terre	1,2x10 <sup>4</sup> et 7,8x10 <sup>3</sup>	3	III ces-
2009	Restaurant	92	2	Poisson au lait de coco	1,1x10 <sup>4</sup>	3	III ces-
2007	nr	75	4	Tomates	7x10 <sup>2</sup>	4	III cytK2+
2008	Restaurant	93	15	Tiramisu	8 x10 <sup>2</sup>	4	III cytK2+
2008	Lycée	33	341	Semoule	1 x10 <sup>4</sup>	5	VII
2008	Maison de retraite	94	28	Purée pomme de terre	1,9 x10 <sup>4</sup>	5	VII
2009	École	94	24	Purée pomme de terre	<4 x10 <sup>2</sup>	5	VII
2010	Lycée	75	44	Salade verte	1x10 <sup>3</sup>	8	IV, V ou II
2010	Centre Médical	76	27	Paëlla	2,8 x10 <sup>4</sup>	8	IV, V ou II
2010	Familial	18	nr	Salade de riz au thon	3,2, x10 <sup>7</sup>	8	IV, V ou II
2010	Hôpital	75	11	Taboulé	4 x10 <sup>3</sup>	8	IV, V ou II
2008	nr	75	nr	Taboulé/ bœuf haché	5 x10 <sup>3</sup> et 1,3 x10 <sup>3</sup>	9	IV, V ou II
2008	Cuisine commerciale	93	2	Salade composée	1,9 x10 <sup>3</sup>	9	IV, V ou II
2009	Restaurant	75	7	Petits pois (semoule)	2x10 <sup>7</sup> (2,4x10 <sup>5</sup> )	9 (14)	IV, V ou II
2007	Restaurant interentreprises	93	13	Sauce béarnaise	1 x10 <sup>2</sup>	18	IV, V ou II
2008	Restauration d'hôtellerie	75	13	Salade de riz	2 x10 <sup>3</sup>	18	IV, V ou II
2008	Restaurant	75	10	Poulet tandoori	4,6 x10 <sup>3</sup>	18	IV, V ou II
2006	Restaurant	92	18	Gâteau de riz	2,2 x10 <sup>3</sup>	18 (7)	IV, V ou II
2008	Restaurant	75	11	Saumon fumé	3 x10 <sup>3</sup>	18	IV, V ou II
2008	Restaurant	92	2	Riz cuit	7,5 x10 <sup>3</sup>	10	IV, V ou II
2008	Restaurant	92	40	Semoule	1,2 x10 <sup>3</sup>	10	IV, V ou II
2009	Restaurant	91	3	Encornet en sauce	2,1 x10 <sup>5</sup>	10	IV, V ou II

\*nr : non renseigné.

foyers où plusieurs profils de *Bacillus cereus* sont retrouvés, en l'absence d'autres pathogènes ; et (3) les foyers à un ou plusieurs types de *Bacillus cereus*, en présence d'autres pathogènes.

La **catégorie 1** représente 27 foyers et 116 isolats analysés au total (pour 9 foyers, un seul isolat a été testé) permettant d'identifier huit profils différents dont le plus fréquent est le n°2 émétique.

La **catégorie 2** représente 13 foyers et 94 isolats analysés. Deux à cinq profils différents de *Bacillus cereus* sont observés par foyer. Le plus grand nombre de profils (n=5) a été identifié dans une Tiac pour laquelle les aliments impliqués étaient de la semoule, trois mélanges d'épices et des herbes de Provence. Au total, 17 profils différents, la plupart à potentiel diarrhéique avéré ou possible, ont été observés, dont les plus fréquents sont les profils n°4 et 18.

La **catégorie 3** représente 15 foyers. *S. aureus* a été détecté en plus de *Bacillus cereus* dans 8 foyers et *C. perfringens* a été détecté en plus de *Bacillus cereus* dans 6 foyers. Ces trois pathogènes ont été détectés ensemble dans un foyer. Soixante-neuf isolats ont été analysés. Au sein de cette catégorie, 13 profils de *Bacillus cereus* ont été observés, dont les plus fréquents étaient le n°3 et 2 à potentiel diarrhéique ou émétique.

Le tableau 4 regroupe les informations concernant les foyers pour lesquels un seul profil de *Bacillus cereus* pouvait être retenu comme responsable de la Tiac. Ils représentent 33 foyers comprenant à la fois les 27 foyers de la première catégorie à un seul profil de *Bacillus cereus*, quatre foyers de la catégorie 2 pour lesquels plusieurs profils de *Bacillus cereus* ont été observés mais un seul a été considéré être responsable du foyer, et deux foyers de la catégorie 3 pour lesquels *Bacillus cereus* est considéré plus compatible avec les symptômes que l'autre pathogène détecté. Ces 33 foyers ont présenté 10 profils différents de *Bacillus cereus* dont les plus fréquents sont le n°2 émétique, et le n°18 diarrhéique. Ces deux profils sont associés aux souches des groupes génétiques III, IV, V ou II. Dans le groupe III, 9 souches portaient le gène *ces* et étaient effectivement associées à des foyers de type émétique. Les 6 autres souches du groupe III ne portaient pas le gène *ces* (deux d'entre elles portent le gène *cyk2*) mais étaient associées à des foyers émétiques, ce qui pourrait suggérer l'existence d'autres formes de toxines émétiques. Les 15 foyers reliés aux souches du groupe IV, V ou II étaient de type diarrhéique (n=10) ou non renseignés (n=5). Il est à remarquer que trois souches du profil n°10 ont été impliquées alors qu'elles ne présentaient pas de caractères de virulence connus, ce qui pourrait suggérer l'existence d'autres formes de toxines diarrhéiques. Enfin, 3 foyers sont reliés à des souches du groupe VII isolées dans des aliments déshydratés reconstitués.

## Conclusions

Le schéma de caractérisation utilisé a permis de progresser dans la connaissance des souches de *Bacillus cereus* associées à des Tiac, par 1/ la mise en évidence pour chaque isolat d'un potentiel émétique ou diarrhéique associé aux caractères de virulence étudiés ; 2/ l'implication confirmée des groupes III et IV, V ou II dans les toxi-infections alimentaires ; 3/ l'élimination de souches présumées non pathogènes du groupe VI ; et 4/ l'émergence du groupe VII retrouvé dans des aliments déshydratés reconstitués (comme les purées de pomme de terre et les semoules) qui devrait constituer une nouvelle espèce, *B. cytotoxicus*, au sein des groupes génétiques chez *Bacillus cereus sensu lato* [1;2].

Cette étude a également montré la possibilité d'isolement de *Bacillus cereus* en présence d'un autre pathogène, *S. aureus* ou *C. perfringens*.

Le schéma présenté constitue une base solide, qu'il conviendrait de compléter par la détermination précise du groupe phylogénétique par le séquençage du gène *panC*, en particulier pour les souches associées aux groupes IV, V et II [2]. L'objectif de l'étude étant de déterminer les marqueurs de virulence pour les isolats issus d'aliments à l'origine de Tiac, le schéma présenté ici devrait également être complété par l'adjonction de nouveaux marqueurs de virulence récemment décrits tels que le gène *hlyII* (codant pour l'hémolysine II) [12], ou d'autres marqueurs de pathogénicité restant à découvrir. Enfin, en perspective, un typage moléculaire (RAPD, PFGE, ou autre) permettrait d'identifier préalablement la diversité des souches au sein d'un échantillon avant de les caractériser plus finement.

## Recommandations

Cette étude a contribué à identifier le danger et à alerter sur le danger réel pour la santé publique de la présence de *Bacillus cereus* associée à de mauvaises pratiques de conservation des aliments cuits, dont la consommation est différée. En effet, une conservation prolongée des aliments cuits à une température élevée permet de sélectionner des souches particulièrement pathogènes de *Bacillus cereus* parmi les multiples souches pouvant être observées dans les aliments. Ainsi, plus la température remonte, plus les souches des groupes III et VII s'approchent des plages de température qui leurs sont favorables, c'est-à-dire de 15 à 45°C pour le groupe III et de 20 à 50°C pour le groupe VII [1]. Or, ces deux groupes renferment des souches particulièrement virulentes.

Cette étude permet ainsi de renforcer les recommandations de l'Anses au sujet de *Bacillus cereus* [3]. Elle montre l'importance de bien renseigner les fiches accompagnant les souches. Ainsi, il serait souhaitable d'obtenir des informations cliniques plus précises pour pouvoir départager les foyers de type émétique de ceux de type diarrhéique. De plus, il faut rappeler l'intérêt d'obtenir des souches cliniques, ce qui n'est pas fait actuellement, pour confirmer la Tiac. Cette étude souligne combien la caractérisation des souches de *Bacillus cereus* en lien avec les informations épidémiologiques peut contribuer à l'amélioration de la surveillance des Tiac.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à souligner que cette étude a été partiellement financée dans le cadre du projet ANR-05-PNRA-013-08 et remercient les Laboratoires vétérinaires départementaux et le Laboratoire central des services vétérinaires qui ont transmis les isolats et les informations relatives aux isolements de *Bacillus cereus* au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses.

## Références

- [1] Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, *et al.* Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol.* 2008;10:851-65.
- [2] Guinebretière MH, Velge P, Couvert O, Carlin F, De Buyser ML, Nguyen-The C. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3388-91. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937725/pdf/0921-10.pdf>
- [3] Afssa. Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : *Bacillus cereus* (révisée en 2011).
- [4] Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol.* 2000;38:254-61. Disponible à : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x/pdf>
- [5] Guinebretière MH, Fagerlund A, Granum PE, Nguyen-The C. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;259:74-80. Disponible à : <http://aem.asm.org/cgi/reprint/71/1/105>
- [6] Delmas G, Galloway A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill F-X, *et al.* Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bull Epidémiol Hebd.* 2006;(51-52):418-22.
- [7] Albert I, Couvert O, De Buyser ML, Catherine D, Faille C, Gohar M, *et al.* Étude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement. *Bull Soc Fr Microbiol.* 2009;24:506-13.
- [8] Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174<sup>Al</sup>. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG (eds). Baltimore, Md: Williams & Wilkins, 1986; pp. 1105-39.
- [9] Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märklbauer E, *et al.* Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:105-13. Disponible à : <http://aem.asm.org/cgi/reprint/71/1/105>
- [10] Francis KP, Mayr R, von Stetten F, Stewart G, Scherer S. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3525-9. Disponible à : <http://aem.asm.org/cgi/reprint/64/9/3525>
- [11] Guinebretière MH, Nguyen-The C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;43:207-21. Disponible à : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01060.x/pdf>
- [12] Cadot C, Tran S, Vignaud ML, De Buyser ML, Brisabois A, Nguyen-the C, *et al.* *InhA1*, *NprA* and *HlyII* as candidates to differentiate pathogenic from non-pathogenic *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1358-65. Disponible à : <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/48/4/1358>