

Investigation d'une TIAC en maison de retraite : un cocktail de *Bacillus cereus*

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à *Bacillus cereus* sont plus fréquemment rapportées qu'il y a 20 ans en France. Elles représentent 5847 cas et 290 foyers confirmés ou suspectés (soit 7 % des cas et 5 % des foyers déclarés) de 1996 à 2005 [2]. Cependant, seules deux TIAC à *B. cereus* survenues en France ont fait l'objet de descriptions détaillées, l'une atypique et difficile à confirmer [12], l'autre, responsable de 3 décès en 1998 [10]. Cet article décrit une TIAC médiatisée, survenue dans une maison de retraite pour personnes âgées atteintes de pathologies psychiatriques, en septembre 2004, dans l'Essonne [11]. L'enquête alimentaire a été délicate en raison des difficultés à obtenir des renseignements précis sur les conditions de préparation, de conservation et de consommation des repas. Les apports et limites de l'enquête épidémiologique et les questions soulevées par les résultats de l'investigation microbiologique sont également présentés.

MÉTHODES

Investigations environnementales (établissement, aliments et eau)

Elles ont été réalisées par les services officiels: Direction départementale des services vétérinaires (DDSV), Direction départementale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes (DDCCRF) et Direction départementale de l'action sanitaire et sociale (DDASS) [11].

Investigations médicales du personnel de l'établissement

Des visites médicales avec prélèvements de gorge et coprocultures ont été organisées par la DDASS.

Enquête épidémiologique auprès des malades

Une enquête de cohorte rétrospective a été réalisée par la DDASS à l'aide du logiciel WinTiac.

Investigations microbiologiques

Ont été réalisées:

- des coprocultures de malades dans différents hôpitaux: recherche de bactéries pathogènes, transmission au Centre national de référence pour les Norovirus de Dijon pour recherche de quatre types de virus;
- une analyse d'eau de la cuisine par le laboratoire d'analyses agréé par le ministère chargé de la santé (SGS);
- une analyse de plats témoins au Laboratoire national vétérinaire de Rungis: recherche de quatre flores indicatrices d'hygiène (flore aérobie mésophile, coliformes totaux, coliformes fécaux, *Escherichia coli*) et de quatre bactéries pathogènes (staphylocoques à coagulase positive, *Clostridium perfringens*, *B. cereus*, salmonelles);
- une caractérisation des isolats de *B. cereus* au Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa et à l'Unité de sécurité et qualité des produits d'origine végétale de l'Inra:
phénotype: aspect des colonies sur milieu de Mossel, hémolyse, mobilité, test d'hydrolyse de l'amidon, croissance à 43 °C, 10 °C et 7 °C [1]; production de 2 entérotoxines en bouillon cœur-cerveille:

Nhe (kit *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay, Tecra) après 6 h à 37 °C et HBL après 24 h à 37 °C (kit *B. cereus* enterotoxin reverse passive latex agglutination, Oxoid),

génotype:

- recherche par PCR (Polymerase Chain Reaction) des gènes de virulence *cytK-1/cytK-2* [8], *ces* (gène impliqué dans la synthèse de la toxine émétique [3]), et du marqueur de psychrotrophie présent sur le gène *cspA* [4]
- typage par la technique RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) « M13-PCR » [7].

RÉSULTATS

Manifestations cliniques

40 personnes ont été malades (âge moyen: 78 ans) sur 70 exposées, soit un taux d'attaque de 57 %. 39 ont été hospitalisées dans huit hôpitaux. Les symptômes ont été principalement de diarrhées (100 %) accompagnées de vomissements (22 %), de douleurs abdominales (15 %), de fièvre (7 %) et de nausées (5 %). L'évolution a été favorable en 24 h sauf pour deux cas restés 15 jours en service de soins intensifs.

Enquête épidémiologique

Elle a été réalisée dans un contexte très difficile:

- les menus étaient diversifiés avec 3 types de texture, normale, mixée ou semi-liquide (pour certaines textures mixées ou semi-liquides, il est de coutume de rajouter de la purée issue de préparations industrielles en flocons). Par ailleurs, de la purée de pomme de terre était proposée à tous les repas en plus des plats habituels;
- les malades ne pouvaient fournir des indications sur leurs consommations;
- le personnel soignant a répondu avec plus ou moins de précision sur les types de repas servis aux malades.

Dans le cadre de l'enquête de cohorte de type rétrospectif, les investigations alimentaires ont porté sur les repas des services (midi et soir) précédant les manifestations cliniques: la veille de la TIAC (J1) et le jour d'apparition des premières manifestations de la TIAC (J2). L'enquête alimentaire n'a pas porté sur la consommation réelle de chaque malade et chaque « non-malade », mais sur les types de repas ou régimes effectivement présentés aux résidents.

Le taux d'attaque s'est montré plus élevé chez les personnes ayant consommé des repas à texture modifiée, mixée ou semi-liquide. Le risque relatif était plus élevé (RR: 3,25) pour le repas de J2 midi que pour les autres repas (RR: 2,00).

Parmi les aliments du repas de J2 midi apparaissant les plus à risque, seul le pâté de foie a été analysé, le steak haché mouliné avec de la purée n'a pas pu être récupéré.

L'hypothèse émise est celle d'une TIAC de type diarrhéique à *C. perfringens* ou à *B. cereus*. Un seul repas est en cause au vu de la courbe épidémique. Celui de J2 midi correspondrait à la durée d'incubation médiane de 14 h (mini 7 h, maxi 47 h), la plus compatible avec ces bactéries (Tableau 1).

Tableau 1 : Durée d'incubation selon le repas mis en cause

Repas	Durée médiane	Durée mini-maxi moins les 3 cas tardifs	Durée mini-maxi avec les 3 cas tardifs
J2 soir	8 h	1 h-17 h	1 h-41 h
J2 midi	14 h	7 h-23 h	7 h-47 h
J1 soir	32 h	25 h-41 h	25 h-65 h
J1 midi	38 h	31 h-47 h	31 h-71 h

Investigations environnementales et microbiologiques

- L'inspection approfondie réalisée par la DDSV et la DDCCRF a mis en évidence des non-conformités des locaux, l'absence d'étiquetage sur certains produits, ainsi que la présence de torchons étalés sur tous les plans de travail pour faciliter leur nettoyage ultérieur. Par ailleurs, il a été observé une gestion inappropriée des repas témoins: quantité et représentativité insuffisantes, conservation à + 10 °C au lieu des + 3 °C prescrits.
- Les examens des quatre membres du personnel de cuisine ainsi que les coprocultures réalisées chez 14 malades n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de germes pathogènes.
- Les résultats des analyses d'eau étaient conformes.
- 17 échantillons de plats témoins issus de 3 des 4 repas précédant la TIAC ont été analysés. Le repas de J1 soir n'a pas été analysé. Les résultats ont été très satisfaisants pour les indicateurs d'hygiène sauf pour un échantillon de pâté de foie (flore aérobie mésophile: 8,3 10⁶ ufc/g). Aucun pathogène n'a été détecté dans 11 échantillons dont le pâté de foie. La présence de *B. cereus* a été observée à des niveaux divers (10² à 10⁴ ufc/g) dans 3 échantillons servis à J1 (petits pois-carottes, purée de légumes verts, purée)

et 3 échantillons servis à J2 (steak haché, purée, purée-haricots verts). Les échantillons trouvés les plus contaminés, petits pois-carottes et purée de légumes verts, ont été servis au repas de J1 midi (Tableau 2).

Caractérisation des isolats de *B. cereus*

Douze isolats présentant des colonies d'aspect caractéristique sur milieu de Mossel et répondant positivement aux tests de confirmation (hémolyse et mobilité) ont été retenus comme étant des *B. cereus* et soumis à analyse complémentaire.

L'analyse des 12 isolats indique la présence de 11 souches distinctes (Tableaux 2 et 3). Les souches sont différentes d'un échantillon à l'autre. Deux souches présentent des caractères psychrotrophes caractéristiques de *B. weihenstephanensis* (espèce non pathogène proche de *B. cereus*, classée dans le groupe VI [9]) et ont donc été considérées comme non suspectes. Cinq souches (n^{os} 2, 8, 11, 12, 15) présentent des caractères génétiques (groupes II à V) et des caractères de virulence (forte production d'entérotoxine Nhe) compatibles avec une implication dans une TIAC de type diarrhéique.

Tableau 2 : Origine et répartition des 12 isolats de *B. cereus* en type RAPD (M13-PCR) et groupes génétiques

Repas	Régime	Aliment	Nombre d'ufc/g	Isolat n°	Profil RAPD	Groupe génétique ^a
J1 midi	normal et mixé	petits pois-carottes	1 300	13	C	VI
				14	G	III
				15	E2c	III
J1 midi	semi-liquide	purée légumes verts	65 000	1	A	VI
				3 ^b	E1	III
				4 ^b	E1	III
				2	E2a	III
J1	?	purée	400	11	F	IV
				12	B	V
J2 midi	normal	steak haché	100	9	D	II
J2 midi	tous	purée	400	10	E2b	III
J2 soir	mixé et semi-liquide	purée haricots verts	100	8	E2d	III

a : attribué d'après les caractères des souches [9], cf. tableau 3.

b : deux isolats correspondant au même profil RAPD, donc probablement à la même souche.

Tableau 3 : Caractéristiques des isolats de *B. cereus* regroupés par profil et groupe génétique

Isolat n°	Hémolyse	Amidon	Nhe ^a	HBL ^a	gène <i>cytK-2^b</i>	gène <i>ces</i>	gène <i>cspA</i>	Croissance à :			Profil RAPD	Groupe génétique ^c
								43°C	10°C	7°C		
13	+/-	+	3	2	-	-	+	-	ntd	+	C	VI
1	+++	+	1	2	-	-	+	-	nt	+	A	VI
9	+++	+	3	2	+	-	-	-	nt	+	D	II
12	++	+	4	64	-	-	-	-	nt	-	B	V
11	+	+	4	64	+	-	-	+	+/-	nt	F	IV
3	++	-	1	0	+	-	-	++	-	nt	E1	III
4	++	-	1	0	+	-	-	++	-	nt	E1	III
2	+	-	5	0	-	+	-	++	-	nt	E2a	III
10	+	-	3	0	-	-	-	+	-	nt	E2b	III
8	++	-	4	0	+	-	-	++	-	nt	E2d	III
15	+	-	5	0	-	-	-	++	-	nt	E2c	III
14	-	+	1	0	-	-	-	+	-	nt	G	III

a : Indice de production d'entérotoxine Nhe fort si ≥ 4 ; Indice de production d'entérotoxine HBL fort si ≥ 64 .

b : aucun des isolats ne porte le gène *cytK-1*.

c : groupe génétique VI non impliqué dans des TIAC, les autres groupes ont été impliqués dans des TIAC [9].

d : nt = non testé.

DISCUSSION

Les résultats des coprocultures ont été négatifs, ce qui ne permet ni de confirmer ni d'infirmer l'étiologie à *B. cereus*

Le personnel et l'eau du réseau ne se sont pas révélés sources de contaminations.

B. cereus est le seul pathogène retrouvé dans les échantillons des trois repas examinés. Les symptômes tendent à décrire une TIAC à *B. cereus* de type diarrhéique. Onze génotypes (profils M13-PCR) ont été mis en évidence dont cinq à potentiel diarrhéique compatible avec les symptômes. La diversité des souches peut suggérer l'implication de plusieurs d'entre elles. Les souches n°s 2 et 15 semblent particulièrement suspectes car (i) elles appartiennent au groupe III, le groupe le plus souvent associé aux TIAC, (ii) elles sont fortement productrices d'entérotoxine Nhe, caractère le plus fréquemment rencontré parmi les souches impliquées dans des TIAC [6], (iii) leur niveau de contamination pourrait être compatible avec le développement d'une TIAC. En particulier, la souche n° 2 a été isolée à un niveau supérieur à $6 \cdot 10^4$ ufc/g dans la purée de légumes verts.

Il n'y a pas eu de contamination croisée entre les six échantillons contaminés car les souches sont différentes d'un échantillon à l'autre. De plus, cette étude met en évidence la présence de plusieurs souches dans un même échantillon. Cette diversité a déjà été soulignée chez *B. cereus*, notamment dans des aliments à base de légumes mais également dans des ingrédients alimen-

taires (protéines de lait, amidon, poivre, herbes), ce qui contribue à la multiplicité des souches retrouvées dans les produits finis [7].

L'utilisation de torchons, étalés sur les plans de travail pendant la préparation des repas, est à proscrire car ils peuvent constituer un moyen de transmission de germes ambiants. Les effets de cette pratique sur la contamination des aliments par *B. cereus* n'ont cependant pas été investigués.

L'absence d'échantillons correspondant aux différents menus proposés soulève la question de la représentativité des repas témoins conservés. Certains aliments susceptibles d'avoir été soumis à des erreurs de préparation (re-mixés) n'ont pu être analysés. Bien que les menus soient très diversifiés dans les maisons de retraite, les échantillons de plats témoins auraient dû être recueillis au moment du service pour être représentatifs de leur état au moment où ils sont consommés. En effet, une conservation prolongée à une température élevée peut sélectionner des souches particulièrement pathogènes parmi la multiplicité observée: plus la température remonte, plus les souches du groupe III seraient compétitives dans les plages de température qui leurs sont favorables (de 15 à 45 °C) [9]. En revanche, la conservation des plats témoins à une température de l'ordre de 10 °C n'a pu entraîner qu'une croissance réduite de souches psychrotrophes et aucune croissance des souches du groupe III en 48 h.

Les deux souches bactériennes les plus suspectes mettent en cause les petits pois-carottes du régime normal et mixé et la purée de légumes verts du régime semi-liquide. Ces deux aliments

proviennent du même repas, servi J1 midi. La purée de légumes est un produit qui a déjà été responsable de TIAC à *B. cereus* [10]. Les flocons de pommes de terre déshydratés servant à préparer la purée peuvent être contaminés par des spores de *B. cereus*. Le processus de fabrication de la purée en poudre ne détruit pas toutes les spores et les traitements thermiques drastiques appliqués sélectionnent les souches les plus thermorésistantes qui présentent le plus fort potentiel pathogène [9]. Les pratiques inappropriées (produits moulinsés conservés trop longtemps à température ambiante) constituent autant de facteurs qui favorisent le développement de tels germes et donc l'apparition des TIAC, en particulier dans les collectivités hébergeant des personnes à risques. Cependant, s'il s'agit en l'occurrence des aliments responsables, la durée d'incubation (minimum 31 h, maximum 47 à 71 h, médiane 38 h) est beaucoup plus longue que celle habituellement décrite qui est de 8 h minimum et rarement supérieure à 24 h [5]. Par ailleurs, la purée de légumes verts consommée par 20 personnes sur 70, ne peut constituer le seul aliment mis en cause. Les petits pois-carottes ont, quant à eux, été proposés à 50 personnes sur 70.

Le niveau de contamination des quatre autres échantillons (< 400 cfu/g) n'est pas très élevé, ce qui n'est pas en faveur de leur implication dans la TIAC. Comme déjà souligné par Talarmin *et al.* [12], seule la confrontation de données cliniques, microbiologiques et épidémiologiques permet d'incriminer un produit de manière sûre. Dans la présente investigation, l'aliment ciblé par l'enquête de cohorte n'a pu être analysé et les coprocultures n'ont pas permis d'isoler de germes suspects susceptibles d'être comparés à ceux isolés des aliments analysés.

CONCLUSION

Les arguments sont en faveur d'une TIAC à *B. cereus* de type diarrhéique dont les aliments responsables n'ont pu être identifiés. La purée de légumes verts et les petits-pois carottes apparaissent suspects mais au vu des données de consommation et des durées d'incubation les concernant, il semble difficile de les incriminer. Cependant, ces deux plats sont révélateurs d'éventuels problèmes survenus pour d'autres préparations non analysées telles que le steak haché mouliné avec de la purée, ciblé par l'enquête de cohorte. En tout état de cause, on relève que plusieurs aliments suspects contenaient de la purée de pomme de terre. L'ajout de purée déshydratée dans un produit mouliné et conservé dans des conditions inadéquates de durée et de température constitue un facteur de risque. Cela souligne les précautions hygiéniques qui doivent être prises dans les établissements hébergeant des personnes sensibles lors de la reconstitution de produits liquides ou semi-liquides à partir de produits déshydratés.

Une partie des travaux présentés dans cet article a été effectuée dans le cadre d'un programme PNRA « *B. cereus* » 2006- 2009 cofinancé par l'ANR, dont l'un des principaux objectifs est d'améliorer la caractérisation des *B. cereus* responsables de TIAC. À cette fin, nous rappelons que vous pouvez envoyer vos souches suspectes à l'unité CEB du Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'afssa (contact : m.debuyser@afssa.fr), comme indiqué dans la lettre-ordre de service n°0719 du 24 07 06 de la DGAL.

RÉFÉRENCES

- [1] Claus D, Berkeley RCW (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174^{Al}. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG (eds). Baltimore, Md: Williams & Wilkins, pp. 1105-1139.
- [2] Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill F-X, De Valk H, Vaillant V, Desenclos JC (2006). Les Toxi-Infections Alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH* 51/52: 418-422.
- [3] Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, et al. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Env. Microbiol.* 71:105-113.
- [4] Francis KP, Mayr R, von Stetten F, Stewart G, and Scherer S. (1998) Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3525-3529.
- [5] Granum PE, Lund T (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:223-228.
- [6] Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* 40:3053-3056.
- [7] Guinebretière MH, Nguyen-The C (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 207-21.
- [8] Guinebretière MH, Fagerlund A, Granum PE, Nguyen-The C (2006). Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:74-80.
- [9] Guinebretière MH, Fabiano LT, Sorokin A, Normand P et al. (2007). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Env. Microbiol.* 10: 851-865.
- [10] Lund T, De Buyser ML, Granum PE (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38:254-261.
- [11] Rapport de synthèse de la DDASS de l'Essonne (2004). Investigation de la TIAC survenue le 30.09.2004 dans une maison de retraite.
- [12] Talarmin A, Nicand E, Doucet M, Fermanian C, Baylac P, Buisson Y (1993). Toxi-infection alimentaire collective à *Bacillus cereus*. *B.E.H.* 33 : 154-155.