

Maisons-Alfort, le 5 juillet 2007

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux toxi-infections alimentaires liées à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques

1- Rappel de la saisine

Par courrier reçu le 20 avril 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 19 avril 2007 par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'avis relatif aux toxi-infections alimentaires liées à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques.

2- Contexte

Cette demande fait suite à la détection et à la quantification d'entérotoxines staphylococciques de type A (SEA), dans plusieurs échantillons de conserves de « chili con carne », suite à une déclaration d'épidémie communautaire (toxi-infection alimentaire collective, TIAC). La contamination de ce produit a fait l'objet d'une alerte au sein du réseau européen « Rapid Alert System for Food and Feed », le 23 mars 2007.

Dans ce contexte, la Direction générale de l'alimentation interroge l'Afssa pour recueillir des informations synthétiques, issues de la littérature scientifique, afin de contribuer à l'amélioration de la gestion des alertes sanitaires, pour lesquelles un staphylocoque à coagulase positive (SCP) est confirmé ou suspecté comme étant le pathogène à l'origine des toxi-infections alimentaires. Ces informations doivent permettre de répondre aux questions suivantes :

- existe-t'il une relation dose-réponse connue, une variabilité d'apparition des troubles liée à la sensibilité individuelle ou au type d'entérotoxine ?
- existe-t'il une corrélation entre l'origine des souches et le type d'entérotoxine détecté ?

3- Méthode d'expertise

Une expertise initiale a été réalisée par trois experts, membres du Comité d'experts spécialisé (CES) « Microbiologie », en collaboration avec deux experts du laboratoire de l'Afssa de Maisons-Alfort (Lerqap). Le groupe d'experts sollicité a également jugé nécessaire d'une part, de considérer la problématique posée par les méthodes d'analyse mises en œuvre pour détecter ce type de contamination alimentaire et d'autre part, de souligner la nécessité d'envisager des mesures de maîtrise en complément de la démarche analytique.

Le produit de cette expertise initiale a été validé par les experts du CES « Microbiologie », le 20 Juin 2007. Le CES « Microbiologie » rend l'avis suivant :

4- Argumentaire

Dans l'ensemble de l'avis le terme SCP est régulièrement repris, tel qu'utilisé dans le règlement CE 2073/2005 et dans les méthodes ISO 6888 (méthodes horizontales pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces)).

Cependant, même si *S. intermedius* (autre espèce à coagulase positive) a été incriminé dans une toxi-infection aux Etats-Unis, *S. aureus* est considéré comme l'agent quasiment exclusif des toxi-infections à staphylocoques (Khambaty et al, 1994). Dans cet avis nous considérerons donc exclusivement les données scientifiques concernant *S. aureus*.

La température minimale de croissance est pour certaines souches de *S. aureus* de 6°C, pour d'autres elle est supérieure à 12°C. La température maximale de croissance est de 48,5°C pour certaines souches alors qu'elle ne dépasse pas 39,5°C pour d'autres. La production d'entérotoxines peut se faire entre 10°C et 48°C mais la zone de température permettant la toxi-

nogénèse est en réalité beaucoup plus étroite pour certaines souches. *S. aureus* est sensible aux acides (pH minimum de croissance de 4) mais tolère une activité de l'eau exceptionnellement basse pour une bactérie (a_w minimum 0,83 en aérobiose et 0,90 en anaérobiose).¹

La cinétique de production des entérotoxines staphylococciques (SE) durant les phases de croissance varie d'un type antigénique à l'autre (Betley et al., 1992). Les souches productrices de SEA, SED ou SEE produisent beaucoup moins de toxines que celles productrices de SEB ou SEC, mais indépendamment des conditions d'incubation (Bergdoll, 1983). Le principal système de régulation des gènes de SE chez *S. aureus* n'a aucune influence sur le gène de la SEA (Tremaine et al., 1993) contrairement aux SEB, SEC et SED qui sont régulées par le gène *agr* (Tseng et al., 2004, 2005). Ces différents éléments contribuent à expliquer la forte prévalence de la SEA dans les cas de toxi-infections alimentaires à staphylocoque.

A) Recommandations apportées dans le cadre de la gestion de la production de conserves de « chili con carne »

a. Description des étapes sensibles du procédé de transformation

Les informations concernant le procédé de transformation, transmises à l'agence dans le cadre de cette demande d'avis, révèlent plusieurs étapes sensibles, susceptibles de permettre la croissance bactérienne et la toxinogénèse. Ces étapes concernent soit l'établissement fournisseur de matières premières, soit l'établissement de transformation.

Chez le fournisseur de viandes précuites :

- Conservation des viandes avant cuisson : pas d'informations, étape supposée maîtrisée.
- Refroidissement des viandes après cuisson (blocs de 8/10 kg) : plus de 10 h pour passer de 63°C à 10°C.

Chez le fabricant de conserves de « chili con carne » :

- Mélange avec légumes surgelés, tomate : 15 min à 20/30°C.
- Vidange de 1200 kg : 45 min à 20/30°C.
- Ligne d'emboîtement : 5 min à 20/30°C plus sauce à 45°C.
- Remplissage d'un autoclave avec 5 paniers : 20 min à 30/40°C.
- Attente avant stérilisation : maximum 80 min à 30/40°C.

b. Stabilité des entérotoxines vis à vis d'un traitement thermique :

Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont généralement reconnues comme thermostables ou partiellement dénaturées par la chaleur. Cependant aux concentrations habituellement rencontrées dans les aliments responsables d'intoxication (0,5 à 10 ng/100 g), Bergdoll (1983) considère qu'elles peuvent être détruites lorsqu'on leur applique des barèmes de stérilisation courants en conserverie appertisée, même si elles résistent mieux à l'inactivation thermique dans les aliments qu'en solution.

Cependant, Bennett (1992) répertorie des cas d'intoxications staphylococciques provoquées par des aliments cuits, incluant une conserve appertisée (bisque de homard) traitée à 118 °C pendant 86 min, mais dont Bergdoll (1989) considère qu'elle avait subi un procédé inadéquat. Bennett (1992) détecte également la SEA dans des boîtes de champignons chinois qui avaient subi une appertisation forte (30 min à 121,1 °C). Le même auteur observe, dans des produits appertisés (barème équivalent à 121,1 °C - 3 min), que les entérotoxines SEA et SED peuvent devenir indétectables (perte d'activité sérologique), tout en conservant leur action émétique sur des chats.

Schwabe et al. (1990) ont montré que l'inactivation thermique des SEA, SEB et SEC est très variable selon l'extrait alimentaire dans lequel elles sont ajoutées (à des teneurs respectives de 5 ; 1 et 1 µg/ml), et en fonction du pH. Un traitement de 80 °C pendant 180 min ne permet pas une inactivation totale de 100 ng/ml de SEA, SEB ou SEC, en tampon phosphate 0,05 mol/l (pH=7,4) (Tibana et al., 1987). Une inactivation totale de SEA à 5 µg/ml en bouillon de bœuf (pH = 6,2) n'est obtenue à 121,1 °C qu'après 27 min (Denny et al., 1971) ($z = 27,8^\circ\text{C}$). Plus récemment, la présence de SEA a pu être détectée dans de la viande de poulet hachée préalablement inoculée

¹Publications/Fiche thématique de l'Afssa/Description de danger microbiologique (www.afssa.fr)

par des SCP (incubée 37°C - 7h) puis frite à 180°C - 55 s et cuite à 150°C - 13 minutes (Pepe et al., 2006).

En outre la dénaturation des entérotoxines par la chaleur semble pouvoir être un phénomène réversible, soit spontanément (Fung et al., 1973), soit sous l'action d'un pH alcalin (pH=11) (Schwabe et al., 1990).

En conclusion, prévoir le comportement d'une entérotoxine staphylococcique (SE) vis à vis d'un traitement thermique est très difficile et doit tenir compte du type de SE, de sa concentration initiale, et de la matrice dans laquelle elle se trouve. Il est donc impossible d'exclure qu'une conserve, contaminée par une ou des SE, en contienne encore après appertisation, même avec des barèmes de stérilisation élevés. A noter que les SE sont également résistantes aux rayonnements ionisants et à la congélation.

c. Simulation de l'évolution de la contamination suivant les différents scénarios thermiques pour justifier le statut d'étape sensible.

Les objectifs de ces simulations sont :

- d'une part, d'évaluer quantitativement l'impact relatif des différentes étapes sensibles du procédé de transformation sur le potentiel de multiplication de cellules de *S. aureus* qui seraient accidentellement présentes dans les viandes et ;
- d'autre part, d'évaluer l'évolution de la contamination en *S. aureus* selon différents scénarios de contamination.

• Modélisation du comportement de *S. aureus* dans la viande

Les cinétiques de croissance de *S. aureus* ont été simulées selon un modèle logistique avec délai et rupture qui intègre une phase de latence caractérisée par sa durée (temps de latence) et une phase de croissance exponentielle caractérisée par le taux de croissance maximal.

L'influence de la température sur le taux de croissance maximal a été simulée selon le modèle des températures cardinales (Rosso, 1993) qui fait intervenir le taux de croissance maximal à la température optimale de croissance, dit taux de croissance optimal, et les températures cardinales de croissance de *S. aureus*.

Les températures minimale, optimale et maximale de croissance de *S. aureus* ont été fixées à, respectivement, 7°C, 37°C et 48°C (ICMSF, 1996).

Le taux de croissance optimal de *S. aureus* dans les viandes a été évalué à partir de données publiées dans la littérature scientifique (Tableau 1). Le pH du « chili con carne » étant compris entre 5,2 et 5,6 pour une activité de l'eau (a_w) probablement proche de l'optimum (0,99) et le taux de croissance optimal étant très variable en fonction des études, les simulations ont été réalisées avec la moyenne des valeurs relevées dans la littérature, *i.e.* 0,94 h⁻¹. Les valeurs minimales (0,17 h⁻¹) et maximales (1,81 h⁻¹) ont également été utilisées afin d'encadrer la plage de croissance possible.

La multiplication des *S. aureus* étant plus lente en anaérobiose, les valeurs ci-dessus ont été divisées par un facteur 1,2 (Whiting, 1984) lorsque la croissance devait être simulée au cœur de blocs de viande.

Tableau 1. Taux de croissance optimaux obtenus pour *S. aureus* dans différentes viandes.

Caractéristiques du produit	μ_{opt} (h^{-1})	Références
Jambon cuit en conserve pH 5,3 aw 0,98	1,15	Genigeorgis, 1969
Viande cuite sous vide pH 5,9 aw 0,985	0,62	Dempster, 1973
Viande cuite sous vide pH 6,0 aw 0,98	0,17	Dempster, 1973
Viande pH 5,6-6,2 aw 0,99	0,24	Scheusner, 1973
Saucisse de Francfort pH 6,0 aw 0,98-0,99 aéro-biose	1,81	Whiting, 1984
Saucisse de Francfort pH 6,0 aw 0,98-0,99 anaéro-biose	1,47	Whiting, 1984
Saucisse cuite sous vide pH 6,6 aw 0,98	1,71	Nielsen, 1985
Viande de volaille cuite sous vide pH 6,3 aw 0,97	0,34	Castillejo-Rodríguez et al., 2002

La simulation de la croissance en conditions dynamiques de température (phase de refroidissement chez le fournisseur de viande) a été réalisée en calculant les paramètres de croissance de manière itérative toutes les minutes et en supposant que l'adaptation de ces paramètres aux nouvelles températures était immédiate.

La phase de latence des bactéries a été négligée lors de l'évaluation de l'impact des étapes sensibles du procédé sur la contamination en *S. aureus*. Celle-ci a, par contre, été prise en compte lors de l'évaluation des différents scénarios de contamination sur l'évolution des populations de *S. aureus*. Nous avons considéré dans ce cas que le produit du temps de latence par le taux de croissance maximal était égal à 2, qui est une valeur caractéristique de cellules en phase stationnaire de croissance légèrement stressées (cette valeur peut être largement augmentée en cas de stress important dû, par exemple, à l'application d'un chauffage ou d'un traitement désinfectant).

- **Estimation du potentiel de croissance de *S. aureus* pendant les étapes sensibles**

- Refroidissement des viandes précuites

Deux modalités ont été prises en compte lors du refroidissement des viandes précuites chez le fournisseur :

- i) évolution de la contamination à la surface des blocs en conditions d'aérobiose avec une cinétique de refroidissement de type exponentielle permettant d'atteindre le domaine de croissance de *S. aureus* (48°C) en 1 h 30 et de passer de 63°C à 30°C en 4 h et de 63°C à 20°C en 6 h ;
- ii) évolution de la contamination au cœur des blocs en conditions d'anaérobiose avec une cinétique de refroidissement de type linéaire permettant d'atteindre le domaine de croissance de *S. aureus* en 3 h et de passer de 63°C à 30°C en 6 h et de 63°C à 20°C en 8 h.

Dans la première situation, le logarithme à base 10 de la contamination (cellules/g) par *S. aureus* en surface des blocs de viande augmente de 1,6 [0,3 - 3,0] (multiplication moyenne du nombre de cellules par 40, maximale par 1000).

Dans la seconde situation, l'augmentation du \log_{10} (*S. aureus* /g) au cœur des blocs de viande est de 1,4 [0,2 - 2,7] (multiplication moyenne du nombre de cellules par 25, maximale par 500).

- Préparation des boîtes avant stérilisation

Les températures retenues pour les simulations sont les températures médianes des fourchettes indiquées, *i.e.*, 25°C du mélange à l'emboîtement et 35°C du remplissage de l'autoclave jusqu'à la phase de stérilisation. La croissance est supposée s'effectuer en conditions d'aérobiose.

L'augmentation du \log_{10} (*S. aureus* /g) de l'étape de mélange jusqu'à l'emboîtement est de 0,3 [0,0 - 0,5] (multiplication moyenne du nombre de cellules par 2, maximale par 3).

L'augmentation du \log_{10} (*S. aureus* /g) de l'étape de remplissage de l'autoclave jusqu'à l'attente avant stérilisation est de 0,7 [0,1 - 1,3] (multiplication moyenne du nombre de cellules par 5, maximale par 20).

Pour l'ensemble des étapes sensibles sous la responsabilité du fabricant de conserves, l'augmentation du \log_{10} (*S. aureus* /g) est de 1,0 [0,1 - 1,8] (multiplication moyenne du nombre de cellules par 10, maximale par 63).

La contamination en *S. aureus* peut donc évoluer de façon significative lors des étapes du procédé de transformation identifiées comme sensibles. Dans les conditions les plus favorables à la multiplication de *S. aureus* (absence de phase de latence et milieu très favorable à la croissance), sa concentration peut être multipliée par 1 000, chez le fournisseur de viande et par pratiquement 100 chez le fabricant de conserves.

- **Estimation du potentiel de croissance de *S. aureus* selon différents scénarios de contamination**

Les simulations présentées précédemment ne prennent pas en compte certains paramètres susceptibles d'influencer fortement les contaminations par *S. aureus*. Il s'agit en particulier de l'état physiologique des cellules contaminant la viande et se traduisant par une phase de latence plus ou moins longue avant la multiplication active des cellules et du moment où se produit cette contamination.

Les scénarios de contamination suivants ont été simulés afin de relativiser les résultats obtenus dans la partie précédente :

- Contamination en surface des viandes chez le fournisseur pendant la phase de refroidissement lorsque la température est supérieure à 48°C par des cellules subissant un choc thermique. Dans ce cas, l'augmentation du \log_{10} (*S. aureus*/g) pour l'ensemble du procédé de fabrication est de 1,9 [0,0 - 3,9].
- Contamination en surface des viandes chez le fournisseur au bout de 4 h de refroidissement lorsque la température est de 30°C par des cellules stressées. Dans ce cas, l'augmentation du \log_{10} (*S. aureus*/g) pour l'ensemble du procédé de fabrication est de 1,6 [0,0 - 3,2].
- Contamination de surface chez le fabricant de conserves lors des phases précédant l'emboîtement par des cellules stressées. Dans ce cas, l'augmentation du \log_{10} (*S. aureus*/g) est de 0,0 à 0,1 [0,0 - 0,4 à 0,5] en fonction du moment où se produit cette contamination.

Ces simulations montrent qu'une contamination massive des conserves de « chili con carne » par des entérotoxines de staphylocoques (supposée intervenir lorsque la concentration en *S. aureus* est supérieure à 10^5 cellules/g) ne semble possible que si la contamination initiale des viandes par *S. aureus* se situe à des niveaux supérieurs à 10-100 cellules/g. D'autres pistes expliquant l'accident observé pourraient être envisagées, telles qu'une contamination initiale des viandes par des entérotoxines avant pré-cuisson ou encore la présence résiduelle de viandes fortement contaminées sur les équipements et non éliminées par les procédures de nettoyage et désinfection.

d. Maîtrise de l'apport de *S. aureus* dans les aliments

Le portage sans symptômes ou portage sain de *S. aureus* est observé chez environ 30% des individus, en population générale, en dehors de toute pathologie². La visite médicale obligatoire ne vise pas le dépistage de ce portage sain ni celui de la plupart des pathologies causées par cette bactérie. La visite médicale n'apporte donc pas la garantie que les opérateurs des industries agroalimentaires (IAA) ne contamineront pas les aliments, d'autant que la visite n'a lieu qu'une fois par an alors qu'un portage ou une infection peut survenir à tout moment.

S. aureus colonise aussi le sol, l'eau et d'une façon générale l'environnement dans les IAA.

- **Apport d'origine humaine**

S. aureus a pour habitat naturel la peau et les muqueuses, notamment nasales, et les plaies purulentes. En outre le portage intestinal est fréquent chez l'homme comme chez certains animaux. *S. aureus* peut donc aussi être trouvé dans les déjections de rongeurs ou d'oiseaux.

Les cellules bactériennes provenant des porteurs symptomatiques ou asymptomatiques sont véhiculées vers les aliments :

- par les aérosols émis lors des mouvements du corps, notamment de la tête,
- par ceux émis par la respiration, le mouchage et l'éternuement,

² <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/staphylo.html> (consulté le 30-05-2007)

- par contact avec la peau souillée, que la souillure provienne du contenu nasal ou d'une plaie.

Par conséquent, pour maîtriser le danger *S. aureus* chez les opérateurs des IAA :

- les mains doivent être lavées régulièrement, notamment après chaque mouchage, après qu'une main a été placée devant la bouche lors d'un éternuement, après chaque utilisation des toilettes,
- en cas de port de gants, ces derniers doivent être changés après chaque contact avec une partie du corps, mouchage ou éternuement,
- le masque doit être porté devant le nez, et pas en dessous du nez,
- tous les cheveux doivent être couverts par une coiffe ou la combinaison, de même que la moustache et la barbe.

Lorsqu'un opérateur présente par exemple des plaies infectées, des infections ou des lésions cutanées, il doit le signaler immédiatement à l'encadrement, de façon à pouvoir être employé à un poste où le risque de contamination de l'aliment est minimisé (Règlement (CE) n°852/2005, Annexe II, Chapitre VIII).

- **Apport d'origine environnementale**

Pour éviter les contaminations en provenance de l'environnement, les bonnes pratiques d'hygiène ou programmes prérequis usuels doivent être mis en œuvre, notamment pour ce qui concerne la lutte contre les animaux nuisibles.

Les cahiers des charges destinés aux fournisseurs doivent reprendre les éléments ci-dessus. Lorsque l'audit d'un fournisseur indique que les mesures d'hygiène ne sont pas appropriées, il doit être envisagé par l'exploitant soit de changer de fournisseur, soit de fixer un critère microbiologique pour *S. aureus* dans le cahier des charges, ou de faire lui-même une analyse à réception des lots.

- **Maîtrise de la croissance de *S. aureus* dans les aliments**

La production de toxine lors de la croissance de *S. aureus* peut avoir lieu entre 10 et 48°C. Tout séjour prolongé d'un aliment entre ces températures peut avoir pour conséquence, s'il est contaminé, la production de toxine. Le plan de maîtrise sanitaire devrait en tenir compte et l'enregistrement continu des températures doit permettre la surveillance de cette mesure de maîtrise et la traçabilité des incidents potentiels.

B- Recommandations apportées dans le cadre de la gestion de l'alerte sanitaire

Afin d'harmoniser les méthodes de détection d'entérotoxines staphylococciques dans les matrices autres que produits laitiers, il serait nécessaire de procéder à la révision de la note de service DGAL/SDHA/N.99/N°8003 dont le titre « *Modification du plan de surveillance 1998-1999 de la contamination microbiologique des denrées, notamment Listeria monocytogenes* » s'avère peu informatif compte tenu de son contenu réel relatif à la recherche des entérotoxines staphylococciques.

Ainsi, la note de service révisée devrait rappeler que :

- la recherche d'entérotoxines staphylococciques ne sera réalisée que dans les matrices susceptibles d'avoir permis la croissance de staphylocoques à coagulase positive (SCP) et la toxinogénèse (Federighi, 2005) ;
- un dénombrement de SCP sur les matrices mentionnées ci-dessus et dont le procédé de fabrication n'est pas susceptible de les avoir détruites, devra être réalisé avant toute recherche d'entérotoxines de staphylocoques. En cas d'isolement de souches, ces dernières devront être conservées en gélose conservation pour un éventuel envoi au LNR SCP ;
- dans le cas d'épisodes toxiques, en plus des points énoncés précédemment, un commémoratif indiquant le nombre de malades par rapport au nombre de personnes exposées, la nature et le délai d'apparition des symptômes devra être adressé avec l'échantillon à analyser ;
- enfin, la recherche des entérotoxines staphylococciques sera réalisée selon le protocole actuellement décrit par la note de service DGAL/SDHA/N.99/N°8003, modifié pour inclure une

étape de pré-traitement par immunoglobuline de lapin, précédant l'utilisation du kit « viande crue » et la mise en œuvre du kit ELISA.

Par ailleurs, la traçabilité de l'origine du prélèvement doit être assurée.

Dans le cas des conserves ou de matrices ne contenant pas de SCP dénombrables, en complément de la recherche d'entérotoxines, il serait utile de réaliser des observations microscopiques, après coloration de Gram, sur des frottis réalisés suivant la norme NF V 08-401 (Contrôle de la stabilité des produits appertisés – Méthode de référence). Ils peuvent permettre de détecter la présence de coques Gram+ en grand nombre dans le produit, observation venant conforter les résultats positifs en entérotoxine.

En cas de doute sur la maîtrise de ces étapes sensibles et en particulier lors de la gestion d'une alerte, la recherche d'entérotoxines peut être réalisée selon le plan d'échantillonnage $n=4$, $c=0$ dans la mesure où la contamination des lots est considérée comme massive (au delà de 60% de boîtes contaminées).

C- Considérations relatives à la relation dose / effet et à la relation dose / réponse

- **Relation dose-effet**

La dose à ingérer pour provoquer les premiers symptômes, chez un individu donné, reste mal définie (Anonyme, 2003). Cependant, plusieurs études ont tenté d'évaluer la dose minimale à ingérer pour provoquer les premiers symptômes.

Mossel et al., (1995) citent une dose émétique 50 de 200 ng de toxines.kg⁻¹ de poids corporel par ingestion. Ils concluent qu'un homme doit ainsi ingérer entre 10 et 20 µg de toxines staphylococciques pour que les premiers symptômes se déclenchent. Des études sur volontaires sains humains ayant ingéré des toxines de types SEA, SEB ou SEC ont montré que la dose minimale provoquant une réponse émétique chez tous les volontaires était de 3,5 µg. Cependant, chez les individus les plus sensibles, la dose ingérée pourrait être abaissée à 0,7 µg (Bergdoll, 1979). D'autres auteurs (Martin et al., 2001) confirment que l'ingestion de moins d'un microgramme d'entérotoxines staphylococciques déclenche les symptômes chez les individus les plus sensibles.

Enfin deux études épidémiologiques réalisées à la suite de deux toxi-infections alimentaires collectives impliquant l'entérotoxine SEA et ayant atteint un grand nombre de sujets, font état de doses ingérées comprises entre 40 et 144 ng pour déclencher les premiers symptômes chez les sujets les plus sensibles (Asao et al., 2003; Evenson et al., 1988).

Considérant,

- d'une part la masse de produit contenu dans une boîte ($m = 833,3 \pm 6,6$ g, $n = 10$ boîtes, DLUO 06/11/09) et la quantité moyenne ingérée par les malades (± 200 g) ;
- et d'autre part, la concentration de toxines de type SEA retrouvées dans les boîtes (DLUO 06/11/09) ($c = 0,17 \pm 0,02$ ng/g, $n = 9$) et le taux de récupération de la toxine de type SEA par la méthode utilisée dans la matrice « chili con carne » égal à 36 %, soit une concentration corrigée estimée à 0,47 ng/g ;

la dose moyenne de SEA ingérée est estimée à 94 ng, ce qui correspond aux précédentes observations réalisées lors d'investigations d'épisodes toxiques (sensibilité individuelle inter-âge et inter-sexe variant de 20 à 162 ng de SEA ingérés pour les hommes à 17 à 259 ng de SEA ingérés pour les femmes (Asao et al, 2003).

- **Relation dose-réponse**

La littérature scientifique ne fait pas état d'études relatives à la relation entre la dose et la probabilité de troubles de santé dans la population de consommateurs.

D- Considérations relatives à l'existence ou non d'une corrélation entre l'origine humaine des souches et le type d'entérotoxine produite.

Les SCP sont des hôtes habituels de la peau et des muqueuses des voies respiratoires de l'homme et des animaux. Leur origine écologique, animale ou humaine, est connue lorsqu'ils ont été isolés directement d'un hôte (humain ou animal) ou peut être déterminée par l'établissement de leur biotype (schéma de Devriese, 1984). Elle peut également être déduite de l'origine de l'échantillon dont ils proviennent, lorsque cet échantillon est peu susceptible de contaminations, par des souches d'origine humaine (lait de vache cru ou viande crue d'origine animale non manipulés).

Différentes études récentes ont ainsi porté sur le potentiel toxigène de souches de SCP d'origines écologique et géographique diverses, et de TIAC en France. Les résultats de ces études, en ce qui concerne la répartition des types d'entérotoxines par origine écologique des souches, sont résumés dans les tableaux ci-dessous. Il faut souligner qu'en raison de la question posée dans la saisine, la SEA fait l'objet d'une colonne séparée des autres types de SE. Mais une même souche de SCP peut produire la SEA avec d'autres SE (SED et SEH par exemple).

Si l'on considère la totalité des souches étudiées dans les études que nous avons recensées ici, hors TIAC, (Tableaux II et III), la proportion des souches productrices de SEA d'origine animale est de 71/1504, soit 4,7%.

Cependant les souches productrices d'entérotoxine A, toutes origines géographiques confondues, sont à 48,5% d'origine humaine (66 souches sur 136) et à 51,5% d'origine animale.

Concernant les souches de mammite bovine, le pourcentage de souches *sea+* varie suivant l'origine géographique des souches, allant de 0% (Smyth et al., 2005, Srinivasan et al., 2006) à 18% (Zecconi et al., 2006) en Europe et aux Etats-Unis, ou 19,8% en Corée (Lim et al., 2004). En France, les chiffres disponibles sont de 0% sur 142 souches alimentaires de biotype non humain (Rosec et al., 2002) et de 8% sur 25 souches de biotype non humain isolées de jambon cru (De Buyser et al., communication personnelle).

Même dans le cadre des TIAC observées en France, où la SEA est très majoritairement l'entérotoxine responsable (Kerouanton et al., 2007), de rares souches de biotype animal (ovin) productrices de SEA ont pu être identifiées (Tableau IV).

Tableau II : Potentiel toxinogène de souches d'origines animales déterminées ou probables (origine alimentaire).

Nombre de souches & origine géographique	Origine des souches	Souches porteuses de gènes d'entérotoxines ¹ (se)			Référence
		<i>sea</i>	<i>seb</i> à <i>see</i>	<i>seg</i> à <i>sei</i>	
191 Europe + Amériques	Animaux	0	60	69	Smyth et al., 2005
462 Europe du Nord +USA	Mammites bovines	12	environ 170	4 SEH (seul type de SE recherché)	Larsen et al., 2002
166 Corée du Sud	Mammites bovines	33	5	Non Testé	Lim et al., 2004
50 Italie	Mammites bovines	9	38	51	Zecconi et al., 2006
78 Etats-Unis	Mammites bovines	0	41	62	Srinivasan et al., 2006
50 Pologne	Viande hâchée crue Saucisses crues	3	8	18	Bania et al, 2006
40 France	Jambon cru	3	10	15	De Buyser, communication personnelle, juin 2007

¹ La somme des souches peut être supérieure au total des souches étudiées car une souche peut produire plusieurs entérotoxines de types différents.

Tableau III : Potentiel toxigène de souches dont l'origine écologique a été déterminée par biotypage.

Nombre de souches testées & origine géographique et ali- mentaire	Biotypes : nombre de souches	Souches productrices de SE ou porteuses des gènes correspondants ¹			Référence
		SEA	SEB, C, D ou E	SEG, H, I ou J	
258 France, produits alimentaires divers	Humain : 116	15	47	91	Rosec et al., 2002
	Bovin : 25	0	0	2	
	Ovin : 9	0	5	0	
	Aviaire : 46	0	0	21	
	Non spécifique :62	0	12	33	
209 (donnent 125 SE+) Italie, produits carnés et laitiers (seules les souches toxigènes ont été biotypées).	Humain :63	31	48	Non Testé	Normanno et al., 2007
	Bovin: 9	2	6	Non Testé	
	Ovin: 29	5	25	Non Testé	
	Aviaire et non spéci- fique : 24	4	20	Non Testé	

¹ La somme des souches peut être supérieure au total des souches étudiées car une souche peut produire plusieurs entérotoxines de types différents.

Tableau IV : Répartition par biotypes et par types d'entérotoxines de souches toxigènes issues de 31 TIAC en France (Kerouanton et al., 2007)

Nombre de souches testées	Biotypes : nombre de souches	SEA	SEB, C, D ou E	SEG, H, I ou J
32	Humain : 26	20	15	12
	Ovin : 2	2	0	0
	Non spécifique : 4	0	0	1

Il apparaît donc impossible en l'état actuel des connaissances d'établir une corrélation stricte entre la production d'entérotoxine de type A (SEA) et l'origine humaine des souches.

Il convient de noter que seules les entérotoxines des types A à E peuvent actuellement être recherchées dans les produits alimentaires. Toutefois, les gènes d'entérotoxines G, H, I et J sont majoritairement détectés parmi l'ensemble des souches de SCP isolées à travers le monde. L'entérotoxine SEH a pu être formellement impliquée dans différentes épidémies communautaires (Ikeda et al., 2005, Jorgensen et al., 2005).

E- Autres considérations

Des bactéries du groupe *B. cereus*, qui produisent une toxine émétique, ont les deux caractéristiques suivantes :

- leur développement et leur production de toxine se produisent dans la même plage de température,
- elles provoquent les mêmes symptômes chez le consommateur (vomissements peu de temps après la prise alimentaire).

B. cereus produit des endospores ou spores bactériennes qui ont la propriété de résister à des chauffages modérés ainsi qu'aux traitements usuels de nettoyage et de désinfection. En cas d'absence de confirmation d'une contamination microbienne dans un contexte d'alerte sanitaire, les SCP ne sont donc pas les seuls microorganismes à suspecter au regard de la symptomatologie observée.

5- Références bibliographiques

- Anonymous (2003). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. SCVPH plenary meeting, March 27-28.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect*, **130** (1) : 33-40.
- Bania, J., Dabrowska A., Bystron J., Korzekwa K., Chrzanowska J., Molenda J. (2006). Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**, 36-41.
- Bennett, R. W. (1992). The biomolecular temperaments of staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **75**, 6-12.
- Bergdoll, M. (1979). *Staphylococcal intoxications* In Food-borne infections and intoxications. H. Riemann and F. L. Bryan (eds). Academic press, New York. pp 443-494.
- Bergdoll, M. S. (1983). Enterotoxins. In: *Staphylococci and staphylococcal infections*. C. S. F. Easman, C. Adlam Ed., Academic Press, London, vol. **2**, 559-598.
- Bergdoll, M. S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne bacterial pathogens*. M. P. Doyle Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 463-523.
- Betley M. J., Borst D. W., Regassa L. B. (1992). Staphylococcal enterotoxins, Toxic Shock Syndrome Toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.*, **55**, 1-35.

- Castillejo-Rodríguez, A.M., Gimeno, R.M.G., Cosano, G.Z., Alcalá, E.B., Pérez, M.R.R. (2002). Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J. Food Prot.*, **65**, 659-665.
- Dempster, J.F., Kelly, W.R. (1973). The fate of a toxigenic strain of *Staphylococcus aureus* in vacuum-packaged bacon. *J. Hyg.*, **71**, 565-569.
- Denny, C. B., Humber, J. Y., Bohrer, C. W. (1971). Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.*, **21**, 6, 1064-1066.
- Evenson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S., Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol.*, **7** (4), 311-316.
- Federighi M. (2005). *Staphylococcus aureus* In Bactériologie alimentaire, compendium d'hygiène des aliments, 2^{ème} édition. Economica (eds), Paris, France. pp 25-51.
- Fung D. Y. C., Steinberg D. H., Miller R. D., Kurantnick M. J., Murphy T. F.. (1971). Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C. *Appl. Microbiol.*, **26**, 6, 938-942.
- Genigeorgis C., Riemann H., Sadler W.W. (1969). Production of enterotoxin-B in cured meats. *J. Food Sci.*, **34**, 62-68.
- Humber J. Y., Denny C. B., Bohrer C. W.. (1975). Influence of pH on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A as determined by monkey feeding and serological assay. *Appl. Microbiol.*, **30**, 5, 755-758.
- ICMSF (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Micro-organisms in foods*, Vol. 5.
- Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K., Makino S.. (2005). Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5, 2793-2795.
- Jorgensen H. J., Mathisen T., Lovseth A., Omoe K., Kvale K. S., Loncarevic S. (2005). An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, **252**, 2, 267-272.
- Kerouanton A., Hennekinne J. A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.*, **115**, 369-375.
- Khambaty F.M., Bennett R.W., Shah D.B. (1994). Application of pulsed field electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol. Infect.*, **113**, 75-81.
- Larsen H. D., Aarestrup F. M., Jensen N. E.. (2002). Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet. Microbiol.*, **85**, 61-67.
- Lim S. K., Joo Y. S., Moon J. S., Lee A. R., Nam H. M., Wee S. H., Koh H. B. (2004). Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 5, 581-4.
- Martin, S. E., Myers, E. R., Landolo, J. J. (2001). *Staphylococcus aureus* In Foodborne Disease Handbook. Y. H. Hui, M. D. Pierson, J. R. Gorham (eds). Marcel Dekker Inc., New York, pp 345-381.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M. (1995). *Essentials of the microbiology of foods* In A textbook for advanced studies. J. Wiley and Sons (eds), Chichester, England. pp 146-150.
- Nielsen et al. (1985). Influence of lactic acid bacteria and the overall flora on development of pathogenic bacteria in vacuum-packed, cooked emulsion-style sausage. *J. Food Prot.* **48**, 28-34.
- Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N. C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E., Celano G. V.. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, **115**, 290-296.

- Pepe O., Blaiotta G., Bucci F., Anastasio M., Aponte M., Villani F. (2006) . *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(11), 7057-7062.
- Rosec J. P., Gigaud O. (2002) . Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.*, **77**, 61-70.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.*, **162**, 447-463.
- Scheusner D.L., Harmon L.G. (1973). Growth and enterotoxin production by various strains of *Staphylococcus aureus* in selected foods. *J. Food Sci.*, **38**, 474-476.
- Smyth D. S., Hartigan P. J., Meaney W. J., Fitzgerald J. R., Deobald C. F., Bohach G. A., Smyth C. J. (2005). Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 401-411.
- Srinivasan V., Sawant A. A., Gillespie B. E., Headrick S. J., Ceasaris L., Oliver S. P. (2006). Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 274-283.
- Tremaine M. T., Brockman D. K., Betley M. J. (1993) Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect. Immun.*, **61**, 356-359.
- Tseng C.W., Zhang S., Stewart G. C. (2004). Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin D gene expression. *J. Bacteriol.*, **186**, 6, 1793-1801.
- Tseng C.W., Stewart G. C. (2005). Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **187**, 15, 5301-5309.
- Whiting R.C., Benedict R.C., Kunsch C.A., Woychik J.H. (1984). Effect of sodium chloride levels in frankfurters on the growth of *Clostridium sporogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, **49**, 351-355.
- Zecconi A., Cesaris L., Liandris E., Daprà V., Piccinini R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.*, **40**, 4, 177-183.

6- Conclusion

Tels sont les éléments d'analyse que l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments est en mesure de fournir en réponse à la saisine relative aux toxi-infections alimentaires liées à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques.

Plus généralement, l'Afssa souligne l'intérêt pour les opérateurs d'élaborer des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP, en cohérence avec l'esprit des règlements du « *Paquet Hygiène* ».

7- Mots-clés

Entérotoxines staphylococciques ; toxi-infection alimentaire collective ; épidémie communautaire ; dose-effet ; dose-réponse ; souches ; mesures de maîtrise.

La Directrice générale de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Pascale BRIAND