

Staphylocoques – Entérotoxines staphylococciques- Produits laitiers

Risques en pathologie humaine

C. LAPEYRE

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSA Paris LCHA – Unité TOxines Microbiennes – 10 rue Pierre Curie – 94704 Maisons Alfort

RESUME - Les toxi-infections alimentaires (TIA) à staphylocoques sont dues en général, à une contamination d'origine humaine. Parmi les dix entérotoxines staphylococciques (SE) connues (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I), SEA représente plus de 75% des TIA. La dose toxique de 100 ng de toxine pour une ingestion a été estimée à partir d'une TIA à lait chocolaté, aux USA (Evenson et al. 1988).

Les produits laitiers sont considérés comme particulièrement à risques, en raison de la présence de staphylocoques à coagulase positive (SCP) dans le lait. Les biotypes animaux sont majoritaires, mais des biotypes humains peuvent aussi être présents. 60% à 80% des souches caprines et ovines produisant essentiellement SECs sont entérotoxino-gènes ; 5% à 30% des souches bovines produisant plutôt SEA sont entérotoxino-gènes, selon les enquêtes. Par ailleurs, plus de 50% des souches humaines sont toxino-gènes et produisent majoritairement SEA, mais aussi SED, SEB et SEC. Différentes études effectuées en collaboration avec l'AFSSA Paris montrent que la toxino-génèse est possible dans des conditions de fabrications fromagères. M. Sesques (1994) a montré que la toxino-génèse de SED et de SEB est possible en lait cru et en conditions thermiques de fabrication de St Nectaire. C. Vernozy et A. Meyrand (1998) ont montré la production de SEA en conditions de fabrication de fromages de chèvre à caillé lactique ou présure. Les conditions technologiques de fabrication des fromages étant favorables à une multiplication des SCP, les 48 premières heures les plus à risques doivent être bien maîtrisées pour ne pas dépasser les niveaux $>10^6$ ufc de SCP, nécessaires à la toxino-génèse. En effet, bien que le nombre de TIA confirmées à entérotoxines dans les produits laitiers soit relativement faible en France ($<5\%$), *S.aureus* reste l'agent bactérien le plus fréquemment mis en cause dans les TIA à produits laitiers. Par ailleurs, les contrôles réalisés à l'AFSSA Paris en 1998 et 1999 montrent une proportion importante de produits au lait cru et au lait thermisé de qualité microbiologique peu satisfaisante, mais la faible présence d'entérotoxines (4,6% de fromages et 33% de laits positifs en entérotoxines; les fromages de chèvre et de brebis semblant plus à risques que les fromages de vache).

Staphylococcus - Staphylococcal enterotoxins – Dairy products

Human hazards

C. LAPEYRE

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSA Paris LCHA – Unité TOxines Microbiennes – 10 rue Pierre Curie – 94704 Maisons Alfort

SUMMARY - Staphylococcal food poisoning are generally due to a contamination of human origin. From the ten known enterotoxins (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I) SEA is the most important (75% of staphylococcal outbreaks). The estimation of human dose is 100ng of enterotoxin per ingestion (Evenson et al. 1988).

Dairy products are frequently implicated in such outbreaks, because presence of coagulase-positive staphylococci (CPS). Different CPS biotypes are present in milk, but, animal biotypes are most important than human biotypes. 60% to 80% of goat and ewe strains are toxinogenic and SEC is more frequently produced ; 5% to 30% of bovine strains producing SEA are toxinogenic. Furthermore, more than 50% of human strains are toxinogenic and produce SEA but also SED, SEB and SEC. Different studies were performed in order to demonstrate the possibility of enterotoxin production in manufacturing conditions of cheeses. M. Sesques (1994) showed SED and SEB production in manufacturing conditions of St Nectaire cheese. C. Vernozy and A. Meyrand (1998) showed SEA production in the manufacturing procedures of goat Camembert-type cheese and of goat lactic cheeses. Cheese manufacturing procedures promote the growth of CPS and production of enterotoxins. Nevertheless, the level of dairy product staphylococcal outbreaks is less than 5% in France from bacterial food poisoning, but, *S.aureus* is the most implicated bacteria in dairy product outbreaks. Nevertheless, examination of dairy product quality during 1998 et 1999 in our laboratory, showed an important number of dairy products with a high level of CPS, but, few of these cheeses were contaminated with staphylococcal enterotoxins (4,6% of and 33% of milk were toxin positives ; goat and ewe cheeses were more hazardous than the cow cheeses).

INTRODUCTION

Les toxi-infections alimentaires (TIA) à staphylocoques arrivent au 2^{ème} rang en France des intoxications d'origine bactérienne. Ce sont exclusivement des intoxications à entérotoxines staphylococciques (SE) produites *in-situ* dans les aliments contaminés par des staphylocoques à coagulase positive (SCP) principalement d'origine humaine. SEA est l'entérotoxine la plus fréquemment impliquée dans les TIA à staphylocoques (>75% des cas). La dose émetique est de 100 ng d'entérotoxine pour une ingestion selon Evenson et al. 1988. Les produits laitiers sont souvent mis en cause dans les intoxications à entérotoxines en raison de leur contamination fréquente par des SCP majoritairement entérotoxigènes et des conditions de fabrication des fromages normalement favorables, à la croissance des SCP et à la production des toxines. Les études de toxino-génèse décrites dans cette communication, dans le lait et en conditions technologiques de fabrication de fromages de St Nectaire et de fromages de chèvre à caillé lactique et présure ont été réalisées en collaboration avec différentes équipes : LIAL d'Aurillac, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, AFSSA Niort et l'AFSSA Paris, pour la quantification du niveau d'entérotoxines. Par ailleurs, des études réalisées à l'AFSSA Paris sont décrites. Elles concernent des résultats préliminaires sur le devenir des entérotoxines dans les produits laitiers et font le point sur la qualité microbiologique des produits laitiers (*S.aureus*/entérotoxines staphylococciques) et sur les aliments reçus à l'AFSSA Paris dans le cadre de confirmations de TIA à staphylocoques, de janvier 1998 à juillet 1999.

METHODES

Préparation des échantillons de produits laitiers pour une recherche des entérotoxines

La préparation des produits laitiers pour la recherche des entérotoxines a été réalisée selon la technique officielle décrite

dans la note de service DGAL/SDHA N° 97/8097, mise au point à l'AFSSA Paris et utilisée en routine au laboratoire, depuis plusieurs années. Elle consiste dans un broyage de 25gr de produit laitier dans 50ml d'eau distillée, suivi d'une précipitation des caséines et d'une centrifugation. La phase aqueuse récupérée est ensuite neutralisée, centrifugée et concentrée par dialyse en présence d'une solution de poly éthylène glycol à 30%, à une température de 5°C ± 3°C. L'extrait concentré est ensuite mis en solution dans 5ml de tampon phosphate salin, pH 7,3.

Détection et dosage des entérotoxines staphylococciques

La détection et le dosage des entérotoxines staphylococciques ont été réalisés sur les extraits concentrés, selon la méthode de référence de l'AFSSA Paris, mise au point par Lapeyre et al. 1987, modifiée et adaptée à la détection des principales entérotoxines A, B, Cs, D et E.

Elle consiste en une identification spécifique des toxines, par un test immunoenzymatique indirect de type sandwich, utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux développé à l'AFSSA Paris. Le niveau d'entérotoxines est déterminé à partir de courbes d'étalonnage effectuées en parallèle de l'analyse des échantillons.

Etude du devenir des entérotoxines staphylococciques sous forme purifiée, au cours du stockage dans des produits laitiers artificiellement contaminés

Du lait pasteurisé, un fromage à pâte pressée cuite (PPC) et un fromage à pâte pressée non cuite (PPNC) ont été utilisés comme supports matriciels de cette étude. Les fromages ont été broyés dans de l'eau (vol. à vol.) avant la contamination par SEA ou SEC ; Le lait a été directement artificiellement contaminé. Les différents échantillons ont ensuite été stockés à 4°C durant plusieurs jours, avant une recherche d'entérotoxines. Le suivi des toxines a été effectué toutes les 24 heures, à partir de J0, par le test EIA de détection de l'AFSSA Paris.

RESULTATS

Production de l'entérotoxine B (SEB) et de l'entérotoxine D (SED), en lait cru, en conditions thermiques de fabrication de fromage St Nectaire M. Sesques, 1994 ; collaboration C. Lapeyre

Conditions thermiques de fabrication : Lait à 34°C/2H - abaissement de la Tre à 18°C en 8H - maintien de la Tre à 18°C pendant 2 J - (Flore mésophile initiale : 3,2 10⁹ ufc/ml de lait)

Souche	N°essai	<i>S. aureus</i> /ml		pH	SEB	Souche	N°essai	<i>S. aureus</i> /ml		pH	SED
MS 84 Biotype humain SEB + (≤200ng/ml)		Inoculum	à 48 H			MS 481 Biotype NS3 SED + (≤ 1µg/ml)		Inoculum	à 48 H		
	Témoin	100	4,5 10 ⁵	5,4			Témoin	100	4,5 10 ⁵	5,4	-
	1	8 10 ⁴	10 ⁷	5,27	-		3	5 10 ³	10 ⁶	5,15	-
	2	8 10 ⁵	5 10 ⁷	5,2	+		4	5 10 ⁴	4 10 ⁷	5,18	+

Les résultats montrent qu'avec des contaminations initiales de 5.10⁴ ou de 8.10⁵ selon la souche de SCP, la production de toxines est possible en conditions de fabrication de St Nectaire, en 48 H, avec une biomasse de 4 à 5 10⁷.

Production de l'entérotoxine A (SEA) en conditions de fabrication de fromages de chèvre à caillé lactique et à caillé présure (C. Vernozy, 1998 ; A. Meyrand, 1998 ; collaboration C. Lapeyre)

Fabrication à caillé lactique				Fabrication à caillé présure					
Etapes de fabrication	Inoculum en ufc/ml de lait*			Inoculum en ufc/ml de lait*					
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
	SEA (ng/g)	SEA (ng/g)	SEA (ng/g)	SCP	SEA (ng/g)	SCP	SEA (ng/g)	SCP	SEA (ng/g)
Lait	ND	ND	ND	10 ³	NA	10 ⁴	NA	8,5 10 ⁵	NA
Caillé	ND	NA	ND	1,2 10 ⁶	NA	3,5 10 ⁷	NA	3 10 ⁷	1,2
J+ 5/6	ND	ND	1	9,1 10 ⁵	0,5	2,2 10 ⁶	0,8	7 10 ⁶	2
J+ 12/13	ND	1	1,3	1,4 10 ⁵	0,6	8,5 10 ⁶	1,1	7 10 ⁶	NA
J + 20/21	0,5	1,3	2,5	10 ⁵	NA	7,8 10 ⁶	1,3	3,3 10 ⁶	2,8
J + 27/28	ND	NA	NA	1,3 10 ⁵	0,6	7 10 ⁵	1,4	1,3 10 ⁶	3
J + 34/35	0,5	1,2	2,1	1,2 10 ⁵	0,7	2 10 ⁶	1,3	2 10 ⁶	3,2

(* Souche de SCP + en SEA (≥ 1µg/ml) - ND : Non détecté ; NA : Non analysé)

(Remarques : Les niveaux de toxine sont corrigés d'un facteur 2, prenant en compte un recouvrement moyen à 50%).

Les résultats montrent qu'une contamination ≤ 10⁴ avec une souche de SCP SEA+ peut être suffisante pour une toxino-génèse en conditions de fabrications de fromages de chèvre à caillé présure ou lactique ; (Toutefois dans cette étude, le facteur souche était particulièrement déterminant).

Le point sur les aliments reçus à l'AFSSA Paris de janvier 1998 à juillet 1999 (C. Lapeyre)
(Cadre : Toxi-infections alimentaires présumées à staphylocoques)

Aliments	Nbre d'aliments	Nbre d'aliments confirmés	Toxines identifiées en ng/g/ml	
Lait et produits laitiers	12	3	(1) + SED 0,3 ng (2) + SEA (0,05 ng et 0,06ng)	
Pâtisseries et ovoproduits	10	1	+ SEA 2ng	
Viandes Charcuteries	18	3	(1) + SEA, SEB, SEC (3,2ng; 0,1ng; 0,05ng) (2) + SEA (2,2ng et 7ng)	
Produits de la mer et végétaux	22	0		
Plats cuisinés	26	2	(2) + SEA (0,8ng et 0,5ng)	
Total	88	9	SEA≅ 89%SET	P. laitiers : 33%

Les résultats montrent la dominance des produits laitiers dans les TIA à staphylocoques ; Toutefois les niveaux de toxines sont plus faibles que ceux trouvés dans les autres aliments et par ailleurs, inférieurs au seuil de toxicité des toxines.

Bilan des analyses réalisées à l'AFSSA Paris - Nombre en SCP/ Entérotoxines (C. Lapeyre)
Cadre : Contrôles officiels et auto contrôles

Catégories	Nbre ≥ 10 ⁴	Toxines en ng/g/ml	Nbre ≥ 10 ⁵	Toxines en ng/g	Nbre ≥ 10 ⁶	Toxines en ng/g	Nbre ≥ 10 ⁷	Toxines en ng/g
PPNC	105		82	(1) + A 0,03ng (1) + A 0,25ng et + D 0,05ng	5	(1) + D 0,15ng (2) + A 0,4ng et traces D		
PMCF	95		159	(1) + SEA 0, 004ng				
PMCL	63							
PM chèvre et brebis	60		58	(1) + A 0,03ng et + D 0,01ng (2) + A (0,04ng et 0,06ng)	24	(16) +		
F. frais de vache	16		25	(1) + A 0,05ng	13		5	
F. frais de chèvre			15	(7) + A et D (0,01ng à 0,03ng)				
Laits ≥10.3	9	3 + C 0,05ng						
Total	348	3 laits + / 9	339	14 fromages + / 339	42	19 fromages + / 42	5	
Total	734							

Les résultats montrent un nombre important de produits laitiers non conformes en SCP. Parmi ceux-ci, 33% des laits étaient positifs en toxines pour 4,6% de fromages dont : 2,7% de PM chèvre et brebis et 1% FF chèvre pour 0,1% de PPNC et 0,1% de FF et PMCF de vache (les niveaux trouvés étaient faibles, mais identiques aux niveaux retrouvés dans les fromages confirmés dans les TIACs à staphylocoques, à l'AFSSA Paris).

Devenir des entérotoxines staphylococciques A et C purifiées, dans des produits laitiers (lait pasteurisé, PPC, PPNC) artificiellement contaminés (C. Lapeyre)

Température de stockage	% de recouvrement de SEA dans le lait pasteurisé				% de recouvrement de SEC dans le lait pasteurisé			
	J0	J1	J2	J5	J0	J1	J2	J5
4°C	100	90	76	50	100	39,3	5,5	0
Température de stockage	% de recouvrement de SEA dans PPC				% de recouvrement de SEC dans PPC			
	J0	J1	J2	J5	J0	J1	J2	J5
4°C	100	104	102	100	100	93,5	78,5	71
Température de stockage	% de recouvrement de SEA dans PPNC				% de recouvrement de SEC dans PPNC			
	J0	J1	J2	J5	J0	J1	J2	J5
4°C	100	85	76	65,5	100	66	41	22

Les résultats montrent une diminution importante des niveaux de toxines en fonction des produits et la durée de stockage.

CONCLUSION - DISCUSSION

Il a été démontré que les conditions technologiques de fabrication de St Nectaire et de fromages de chèvre étaient favorables à la production des entérotoxines de staphylocoques, avec des contaminations initiales en SCP toxigènes parfois faibles (de 10^3 , 10^4 à $6 \cdot 10^5$) et une biomasse en SCP dans les fromages voisine ou $> 10^6$ /g. La présence d'entérotoxines dans les fromages est bien sûr dépendante du nombre de SCP entérotoxigènes mais aussi, du facteur souche. En effet, la production de SED a été montrée en conditions de fabrications du St Nectaire avec un inoculum de $5 \cdot 10^4$ et une biomasse en SCP de $4 \cdot 10^7$ en 48 heures, alors qu'un inoculum de $8 \cdot 10^5$ était nécessaire pour la synthèse de SEB, en 48 heures, avec une biomasse en SCP de $5 \cdot 10^7$. De plus, avec une souche au caractère toxigène exceptionnel, C. Vernozy et A. Meyrand ont montré la synthèse de SEA, en conditions de fabrication de fromages de chèvre à caillé présure et à caillé lactique avec des contaminations très faibles de 10^3 et 10^4 et des biomasses en SCP voisines ou $> 10^6$. Ces résultats suivent les conditions de synthèse des entérotoxines staphylococciques en milieu de culture : SEA et SED sont plus faciles à produire que SEB et SEC. Bien que des conditions très favorables à une production de toxine étaient rassemblées dans les expérimentations sur les fabrications de fromages de chèvre : souche contaminante productrice de SEA peu exigeante pour la synthèse de toxine et de plus très toxigène ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$ en conditions de culture au laboratoire), les résultats montrent bien que le nombre de SCP toxigènes ($> 10^6$) dans les fromages n'est pas le seul facteur à risques, mais que le facteur souche est lui aussi déterminant. Le risque en entérotoxines semble plus important avec des SCP producteurs de SEA ou SED qu'avec des SCP producteurs de SEB ou SEC. Toutefois, il faut veiller à bien maîtriser les conditions de fabrication pour ne pas dépasser les niveaux en SCP $> 10^6$, favorables à la toxinogénèse. En France, bien que le nombre de TIA confirmées à entérotoxines dans les produits laitiers soit relativement faible ($< 5\%$), *S. aureus* reste l'agent bactérien le plus fréquemment mis en cause dans les TIA à produits laitiers, (Haeghebaert et al. 1998).

Les contrôles réalisés à l'AFSSA Paris en 1998 et 1999 montrent bien une proportion importante de produits laitiers de qualité microbiologique peu satisfaisante, avec toutefois, une faible contamination en entérotoxines (4,6% de fromages et 33% de laits positifs en toxines, avec des niveaux faibles mais voisins de ceux retrouvés dans les produits laitiers confirmés dans des TIA à staphylocoques); les fromages de chèvre et de brebis semblent plus à risques que les fromages de vache. Par ailleurs, les niveaux d'entérotoxines trouvés dans des produits laitiers confirmés dans les TIA à staphylocoques apparaissent faibles par rapport à ceux trouvés dans les autres aliments et en général bien en dessous du seuil de toxicité. Cette différence est due au faible rendement d'extraction des entérotoxines dans les produits laitiers ($\approx 50\%$), mais est peut être aussi liée, à un comportement particulier des entérotoxines dans les produits laitiers (les entérotoxines pourraient s'agréger aux protéines du lait et ne plus être alors totalement sérologiquement détectables).

Evenson Mary L., Wards Hinds M., Berstein R. and Bergdoll M., 1988. Inter. J. Food. Micro. 311-316.

Haeghebaert S. F. Le Querrec, V. Vaillant, et P. Bouvet, 1998. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1997. BEH, 41, 177-181.

Lapeyre C., Janin F. ans S. Kaveri, 1988. Food Microbiology, 5, 25-31.

Meyrand A. Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C. E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C. and C. Vernozy-Rozand, 1998 J. of Applied Microbiology, 85, 537-544.

Sesques M., 1994. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard de Lyon, année 1994.

Vernozy-Rozand C., Meyrand A., Mazuy C. Delignette M.L., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C. and Y. Richard, 1998. J. of Dairy Research, 65, 273-281.

Note de service DGAL/SDHA/N.97/N°8097, du 28 mai 1997. Techniques d'identification et de détection des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers.