



Camille Delarras

PRATIQUE EN MICROBIOLOGIE DE LABORATOIRE

Recherche de bactéries et de levures-moisissures



TEC
& DOC

Lavoisier

Pratique en microbiologie de laboratoire

Recherche de bactéries et de levures-moisissures

Camille Delarras

Ancien maître de conférences en microbiologie à l'IUT de Brest



www.editions.lavoisier.fr

Chez le même éditeur

Le technicien d'analyses biomédicales

J. Béraud, 2^e édition, 2014

Comportements et consommations alimentaires en France

P. Hébel, coord., 2012

Aliments fonctionnels

Collection « Sciences et techniques agroalimentaires »

M. Roberfroid, B. Coxam, N. Delzenne, coord., 2008

Analyse des risques alimentaires

Collection « Sciences et techniques agroalimentaires »

M. Feinberg, P. Bertail, J. Tressou, P. Verger, coord., 2006

Droit communautaire et international de la sécurité des aliments

M. Lewandowski-Arbitre, 2006

Risques et crises alimentaires

Collection « Sciences et techniques agroalimentaires »

C. Lahellec, coord., 2005

Les comportements alimentaires

Collection « Sciences et techniques agroalimentaires »

D. Chapelot, J. Louis-Sylvestre, coord., 2004

Direction éditoriale : Emmanuel Leclerc

Édition : Céline Poiteaux

Fabrication : Estelle Perez

Couverture et mise en pages : Patrick Leleux PAO

Images de couverture : © Dmytro Sukharevskyy © Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com

© 2014, Lavoisier, Paris

ISBN : 978-2-7430-1565-7

Avant-propos

« *Les risques microbiologiques liés aux denrées alimentaires constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'Homme.* »

Règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (*Journal Officiel de l'Union européenne* du 22 décembre 2005, L398/1).

- **Micro-organismes recherchés**

Les bactéries font l'objet des chapitres spécifiques 3 à 8 et 10 à 15 ; le chapitre 9 traite des levures et des moisissures.

Pour la recherche des bactéries, sont proposées :

- une partie théorique comportant « classifications, habitats, surveillance et épidémiologie, caractères principaux et éventuellement spécifiques » ;
- une partie pratique présentant les protocoles de recherche et de dénombrement des micro-organismes dans les différents produits destinés à l'homme, en incluant les milieux de culture utilisés ; cette présentation est complétée par l'identification de ces micro-organismes à l'aide de la micro-méthode API bioMérieux® SA et/ou de milieux chromogènes d'identification.

- **Produits à analyser ou à contrôler**

Pour les eaux, les analyses microbiologiques ont fait l'objet de la deuxième édition de *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux* (2010). Cependant, des éléments nouveaux ou essentiels sont rapportés ici, ainsi que les chapitres spécifiques pour les eaux « *Legionella* », « *Leptospira* » et « *Vibrio* » avec des nouveautés.

Pour les denrées alimentaires, sont présentées les analyses microbiologiques imposées par le règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission des Communautés européennes du 15 novembre 2005, modifiées par le règlement (CE) n° 1441/2007 du 5 décembre 2007.

Pour les produits pharmaceutiques, seuls quelques éléments d'informations sont apportés, sans entrer dans les détails des Pharmacopées française et européenne.

Pour les produits cosmétiques, le contrôle microbiologique est exposé dans les chapitres concernés, en se fondant sur les données actuelles et sur la nouvelle réglementation ; par ailleurs, le lecteur pourra également prendre connaissance des informations sur les produits cosmétiques (sources de contamination...) dans le chapitre 11 d'un précédent ouvrage (Delarras, 2007).

Pour l'environnement hospitalier et industriel, des éléments sont proposés en s'appuyant principalement sur les données des fabricants de milieux de culture.

- **Milieux de culture**

Les milieux de culture d'usage courant, d'isolement, d'identification, etc., pour la microbiologie médicale, alimentaire, des eaux, des produits cosmétiques et pharmaceutiques présentés dans cet ouvrage résultent de notre choix. Leur composition chimique est reproduite avec l'aimable autorisation des fabricants ou distributeurs de ces produits : AES Chemunex (A bioMérieux Company), bioMérieux® SA, Bio-Rad, Laboratoires Humeau et VWR International SAS (produits Merck) (se reporter à l'annexe 6 pour les adresses des fabricants et à la bibliographie).

Les informations techniques relatives à la lecture et à l'interprétation de ces milieux sont établies à partir des fiches techniques des milieux de culture de ces fabricants, mais aussi parfois à partir de la bibliographie. La disponibilité commerciale indiquée pour les milieux de culture (milieu déshydraté, flacons, tubes, boîtes de Petri...) est purement indicative car elle peut être modifiée à tout moment par le fabricant.

Par ailleurs, les utilisateurs de ces milieux de culture doivent impérativement prendre connaissance des précautions d'utilisation, des conditions de stockage, du mode opératoire, du contrôle de qualité, des performances, de l'élimination des déchets, etc., mentionnés dans les fiches techniques des fabricants, toutes ces informations ne pouvant être reprises dans cet ouvrage.

Les normes NF et/ou EN et/ou ISO (Afnor) relatives aux méthodes de travail en microbiologie et aux milieux de culture (mentionnés dans les fiches techniques des fabricants) sont simplement citées à titre d'information, car elles ne sont pas reproductibles.

- **Classification des bactéries recherchées**

Les bactéries recherchées en microbiologie des aliments, des eaux, clinique ou autres sont classées dans cet ouvrage dans la nouvelle classification phylogénique (Larpen, 2000 ; *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2^e édition, 2004) avec des mises à jour éventuelles. L'objectif est de fournir une base de classification de ces bactéries, sachant que celle-ci est en évolution permanente avec des remaniements taxonomiques et la description de nouvelles espèces ou sous-espèces.

Pour les salmonelles, la taxonomie actuelle de ces germes (2005) est présentée dans le chapitre 6 « *Enterobacteriaceae* (entérobactéries) ». Les sérovars de la sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cités dans cet ouvrage sont écrits sous la forme recommandée ; par exemple *Salmonella* Typhi a comme dénomination complète *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi.

- **Méthodes de travail de la biologie moléculaire**

Les méthodes de travail de la biologie moléculaire (*polymerase chain reaction* ou PCR, *reverse transcriptase-PCR* ou RT-PCR, *real-time PCR*) sont illustrées seulement par des exemples de PCR en temps réel (*Campylobacter*, *Cronobacter*, *Legionella*, *Listeria*, *Salmonella*). Toutefois, la présentation complète de ces méthodes sort du cadre de cet ouvrage.

- **Nouveaux services de l'État**

Dans le cadre de la modernisation de l'État, le gouvernement a lancé en juin 2007 la révision générale des politiques publiques (RGPP) qui a pour effet de regrouper des services de l'État.

Voici un tableau de correspondance entre les nouvelles et les anciennes directions de l'État citées.

Tableau 1. Nouvelles directions de l'État.

Nouvelles directions ¹ (noms et sigles)	Regroupant...
DREAL, DDEA	
Directions régionales de l'environnement, de l'aménagement et du logement DREAL ² (création au 1 ^{er} janvier 2009)	Diren, DRE et Drire
Directions départementales de l'équipement et de l'agriculture DDEA ² (création au 1 ^{er} janvier 2009 et au 1 ^{er} janvier 2010 suivant les départements) (voir ci-dessous DDT)	L'essentiel de l'ex-DDE et la Ddaf
Directions départementales interministérielles DDI (création au 4 décembre 2009, au nombre de 2 ou 3 suivant les départements)	
1^{re} direction : DDT ou DDTM Création au 1 ^{er} janvier 2010	
DDT Directions départementales des territoires	DDEA (voir ci-dessus) et une partie des services de la Préfecture

Tableau 1. suite

Directions départementales interministérielles DDI (création au 4 décembre 2009, au nombre de 2 ou 3 suivant les départements)	
DDTM Directions départementales des territoires et de la mer pour les régions littorales	DDEA (voir ci-dessus), une partie des services de la Préfecture et de l'ex-direction des affaires maritimes (DDAM ou DIDAM)
2^e direction : DDCSPP et parfois 3^e direction : DDPP et DDCS Création au 1 ^{er} janvier 2010	
DDCSPP Directions départementales de la cohésion sociale et de la protection des populations	Ex-DDSV et ex-DDCCRF, une partie des ex-DDASS, ex-DDJS et ex-Délégation aux droits des femmes
DDPP pour les villes de plus de 400 000 habitants Directions départementales de la protection des populations	Ex-DDSV et ex-DDCCRF
DDCS pour les villes de plus de 400 000 habitants Directions départementales de la cohésion sociale	Une partie des ex-DDASS, ex-DDJS et ex-délégation aux droits des femmes

1. Pour les missions en rapport avec la thématique de cet ouvrage : voir chapitre 1, paragraphes 5, 6 et 7.
2. Voir Delarras *et al.*, 2010.

Remerciements

À Christiane Delarras, mon épouse, pour la relecture et la correction du manuscrit.

À toutes les personnes qui avaient soutenu *Microbiologie pratique* publié en 2007, dont la deuxième partie a servi de base à ce nouvel ouvrage.

Aux sociétés de produits de microbiologie ou de matériels qui nous ont autorisés à utiliser leur documentation technique pour le présent ouvrage et qui sont représentées par :

Madame Isabelle Desforges, Monsieur Xavier Salleyron et Madame Anne Suisse-Vitrant (bioMérieux, Marcy l'étoile),

Monsieur Christophe Fisch-Farkas (Laboratoires Humeau, La Chapelle-sur-Erdre),

Monsieur Christophe Gincheleau (AES Chemunex, groupe bioMérieux, Combourg),

Monsieur Frédéric Martinez, Monsieur Yannick Bichot (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette),

Madame Kathy Spinosi (VWR International SAS, Fontenay-sous-Bois),
et également à Madame Colette Lemoine (IUT, Brest),

Un remerciement tout particulier à Monsieur Jean-Paul Larpent, professeur honoraire de microbiologie à l'Université Blaise-Pascal de Clermont-Ferrand.

À Inès, Anna et Lucie.

Sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Afnor	Association française de normalisation
Afssa	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Afsse	Agence française de sécurité sanitaire environnementale
Afsset	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANC	Acide nalidixique, colimycine
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ansm	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APHA	American Public Health Association
APW	<i>Alkaline peptone water</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Aw	<i>Activity of water</i>
BAM	<i>Bacteriological analytical manual</i>
BCIG	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide
BEH	<i>Bulletin épidémiologique hebdomadaire</i>
BLSE	Bétalactamases à spectre étendu
BPF	Bonnes pratiques de fabrication européennes
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
BPO	Bactérie pathogène opportuniste
BPS	Bactérie pathogène spécifique
C.CLIN	Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
CCOMS	Centre collaborateur de l'OMS
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CEE	Communauté économique européenne (appelée maintenant Union européenne)
CEN	Comité européen de normalisation

CIP	Collection de l'Institut Pasteur
Cire	Cellule interrégionale d'épidémiologie
CLIN	Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CNR	Centre national de référence
CNRCH	Centre national de référence des <i>Campylobacter</i> et des <i>Heliobacter</i>
CNRL	Centre national de référence des Leptospires
CNR-L	Centre national de référence des <i>Legionella</i>
CNRSS	Centre national de référence des <i>Salmonella</i> et des <i>Shigella</i>
Cofrac	Comité français d'accréditation
CPM	Colites pseudo-membraneuses
CSAH	Comité scientifique de l'alimentation humaine
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CSMVSP	Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique
Dass	Direction des affaires sanitaires et sociales de Nouméa
Ddass**	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DCCRF	Direction de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DDAF**	Direction départementale de l'agriculture et de la forêt
DDAM**	Direction des affaires maritimes
DDCCRF**	Direction départementale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DDCS*	Direction départementale de la cohésion sociale
DDCSPP*	Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations
DDE**	Direction départementale de l'équipement
DDEA*	Direction départementale de l'équipement et de l'agriculture
DDI*	Direction départementale des territoires
DDJS**	Direction départementale de la jeunesse et des sports
DDPP*	Direction départementale de la protection des populations
DDTM*	Direction départementale des territoires et de la mer
DDSV**	Direction départementale des services vétérinaires
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGDDI	Direction générale des douanes et droits indirects
DG SANCO	Direction générale de la santé et des consommateurs (de la Commission européenne)
DGS	Direction générale de la santé
DIDAM**	Directions interdépartementales et départementales des affaires maritimes
DIECCTE	Directions des entreprises, de la concurrence, de la consommation, du travail et de l'emploi (dans les DOM)
Diren**	Direction régionale de l'environnement
DNO	Directive nationale d'orientation
DO	Déclaration obligatoire

Dom-Tom	Départements et territoires d'outre-mer
Draaf	Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt
Drass	Direction régionale des affaires sanitaires et sociales
DRE**	Direction régionale de l'équipement
DREAL*	Direction régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement
Drire**	Direction régionale de l'industrie, de la recherche et de l'environnement
DSP	<i>Diarrhetic shellfish poison or poisoning</i>
DSV	Direction des services vétérinaires
ECA	<i>Enterobacterial common antigen</i>
ECDC	European center disease prevention and control
ECM	<i>Erythema chronicum migrans</i>
EEE	Espace économique européen
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority)
ELDSNet	European legionnaires' disease surveillance network
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EN	<i>European standard</i> (norme européenne)
EOH	Équipe opérationnelle d'hygiène
EPAS	Eau peptonée alcaline salée
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entéropathogène
ESST	Encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles
ETEC	<i>Enterotoxinogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène
EWGLI	European Working Group for <i>Legionella</i> Infections
FDA	US Food and drug administration
FAO	Food And Agriculture Organization
FC	Fièvre charbonneuse
FEFIDEC	Fédération finistérienne de défense contre les ennemis des cultures
FERCO	Fédération européenne de restauration collective
GC %	Guanine et cytosine dans l'ADN (exprimées en moles pour 100)
GEA	Gastro-entérites aiguës
HACCP	<i>Hazard analysis critical control point</i>
HAS	Haute Autorité de Santé
HCSP	Haut comité de la santé publique
H ₂ S	Hydrogène sulfuré
Ifremer	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IMS	Institutions médico-sociales
IMVIC	Indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, inositol, citrate
InVS	Institut national de veille sanitaire
IPNC	Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
ISO	International Standard Organization (Organisation internationale de normalisation)
JO ou JORF	<i>Journal officiel de la République française</i>
JO	<i>Journal officiel de l'Union européenne</i> , nouvelle dénomination du JOCE (depuis le 1 ^{er} février 2003)
LABM	Laboratoires d'analyses de biologie médicale

LCR	Laboratoire communautaire de référence
LIN	Lutte contre les infections nosocomiales
JOCE	<i>Journal officiel de la Communauté européenne</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDC	Lysine décarboxylase
LNR	Laboratoire national de référence
LRUE	Laboratoire de référence de l'Union européenne
MAAP	Ministère chargé de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
MAS	Maison d'accueil spécialisée
MAT	<i>Microscopic agglutination test</i>
MDO	Maladies à déclaration obligatoire
MES	Matières en suspension
MISP	Médecin inspecteur de santé publique
MPN	<i>Most probable number</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MST	Maladie sexuellement transmissible
MUD	4-méthyl-umbelliféryl- β -D-glucoside
MUG	4-méthyl-umbelliféryl- β -D-glucuronide
NF	Norme française
OGM	Organismes génétiquement modifiés
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONF	Office national des forêts
ONCFS	Office national de la chasse et de la faune sauvage
ORL	Otorhinolaryngologie
PC	Plan de contrôle
PCA	<i>Plate count agar</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNSE	Plan national santé-environnement
PS	Plan de surveillance
PVD	Pays en voie de développement
RAA	Rhumatisme articulaire aigu
RAL	Réaction d'agglutination-lyse
RGPP	Révision générale des politiques publiques
RMTC	Relevé des maladies transmissibles au Canada
RNSP	Réseau national de santé publique créé en 1992, remplacé par l'InVS en 1999
RPF	<i>Rabbit plasma fibrinogen</i> (plasma de lapin et fibrinogène)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-PCR</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SCL	Service commun des laboratoires
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCP	Staphylocoques à coagulase positive
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
SIG	Système d'information géographique
SIN	Signalement des infections nosocomiales

Sral	Service régional de l'alimentation
STEC	<i>Escherichia coli</i> (producteurs de) shiga-toxines
Tar (s)	Tour(s) aérorefrigérante(s)
TDH	<i>Thermostable direct hemolysin</i>
Tia	Toxi-infection alimentaire
Tiac	Toxi-infection alimentaire collective
TN	Tâche nationale
TRH	<i>TDH-related hemolysin</i>
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
UE	Union européenne
UFC	Unités formant colonies
USP	United States Pharmacopeia
VNC	Viable non cultivable
VNC	Vibrions non cholériques
VP	Voges-Proskauer
VSM	Viandes séparées mécaniquement
VTEC	<i>Verotoxinogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> vérotoxino-gène

* Désigne les sigles des nouveaux services de l'État présentés dans le tableau 1 de l'avant-propos de cet ouvrage.

** Désigne les sigles des anciens services de l'État affectés par la RGPP (correspondance avec les nouveaux services dans le tableau 1 de l'avant-propos).

Clostridium

(Bactéries à Gram +)

1. Classification phylogénique

Pour cette classification, voir chapitre 1, tableau 6.

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum XIII : Firmicutes ou bactéries à Gram +, G + C % faible.
- Classe II : *Clostridia*.
- Ordre I : Clostridiales.
- Familles : 19 familles dont la famille I des *Clostridiaceae*.
- Dans la famille des *Clostridiaceae* : 13 genres dont le genre *Clostridium*.

2. Espèces principales et habitats

Les *Clostridia*, bactéries anaérobies sporulées comprennent plus de 150 espèces (*Bergey's manual*, 2004). Elles peuvent être des espèces saprophytes non pathogènes pour l'homme, des espèces saprophytes pouvant être pathogènes occasionnelles ou des espèces toxigènes très pathogènes pour l'homme ou pour des animaux (voir annexe 1).

Les espèces principales sont présentées en considérant leur habitat naturel, leurs caractères particuliers, leur pouvoir pathogène ou leur intérêt.

2.1. Groupes physiologiques

Les *Clostridia* peuvent être classées en quatre groupes physiologiques qui interviennent dans de nombreuses fermentations industrielles. Ils comportent (Larpent, 2000) :

- plus de 60 espèces saccharolytiques dont *Clostridium botulinum* E, *Cl. difficile*, *Cl. fallax*, *Cl. novyi* A, *Cl. septicum*, *Cl. thermobutyricum*, *Cl. thermocellum*, *Cl. thermolacticum*... ;
- des espèces protéolytiques dont *Clostridium histolyticum*, *Cl. tetani*... ;
- des espèces protéolytiques et saccharolytiques dont *Clostridium bifermens*, *Clostridium botulinum* A, B, C, D et F, *Cl. novyi* B et C, *Cl. perfringens*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*... ;
- des espèces spécialisées.

Parmi ces espèces, certaines sont pathogènes pour l'homme ou pour les animaux, d'autres forment le groupe des *Clostridia* sulfitoréducteurs (voir paragraphe 2.3).

Toutes ces espèces sont classées dans la famille des *Clostridiaceae* de la classification phylogénétique (*Bergey's manual*, 2004).

2.2. Espèces pathogènes

Les *Clostridia* sont des bactéries anaérobies strictes de la flore exogène, d'origine tellurique, conservant toute leur vitalité dans les sols grâce à leurs spores résistantes ; certaines espèces sont parfois commensales de l'intestin de l'homme et des animaux. Des espèces produisant des toxines sont des bactéries pathogènes spécifiques (BPS) engendrant des maladies spécifiques redoutables pour l'homme et pour les animaux.

2.2.1. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum, est une bactérie saprophyte des sols, des eaux et des sédiments aquatiques (eaux douces et marines), dont la spore thermorésistance peut transiter par le tube digestif des animaux (le porc est porteur sain de *Cl. botulinum* de type B). Par les matières fécales, la spore se retrouve dans les sols et des aliments tels que fruits et légumes pour l'homme ou fourrage pour les animaux, qui sont ainsi contaminés.

Les poissons peuvent aussi se contaminer au niveau de sédiments ainsi que les oiseaux au niveau de décharges de déchets terrestres ou de boues lacustres ; animaux, poissons et oiseaux pourront alors contracter le botulisme animal (voir paragraphe 3.2.1.2).

L'homme peut se contaminer en consommant des conserves ou des semi-conserves d'aliments, souvent d'origine artisanale ou familiale mal préparées ou mal stérilisées (jambon de porc, fruits et légumes, poissons). Dans certaines conditions physico-chimiques, la spore présente dans l'aliment peut produire un bacille qui va se multiplier et élaborer une exotoxine protéique très nocive (neurotoxine).

L'ingestion de la neurotoxine botulinique contenue dans un aliment contaminé, provoquera chez l'Homme 24 à 48 heures plus tard, une intoxication alimentaire appelée botulisme ; elle s'exprimera par une neuroparalysie (vision trouble, difficultés de déglutition et de parole...).

En fait, *Clostridium botulinum* présente huit types toxinogènes désignés A à G, agents du botulisme humain ou animal :

- les types A, B (d'origine terrestre), E et F (d'origine aquatique) concernent l'homme ;
- les types C1 et C2 se rapportent aux oiseaux ;
- le type D est relatif aux bovins et aux équidés ;
- le type E, relatif aux poissons et produits dérivés, peut contaminer l'homme ;
- le type G est responsable de mort subite chez le nourrisson.

📖 Pour plus d'informations sur le botulisme humain en France : voir Carlier *et al.*, 2007, et paragraphe 3.2.1.1.

2.2.2. Clostridies des gangrènes gazeuses

Clostridium perfringens (voir paragraphe 2.2.3), seul ou associé aux espèces *Cl. bifermentans*, *Cl. histolyticum*, *Cl. novyi* (ex-*Cl. oedematiens*), *Cl. septicum*, est l'agent des gangrènes gazeuses. Cette appellation recouvre un état infectieux qui se traduit par une nécrose et une putréfaction des tissus du malade ; cette dégradation tissulaire, liée à l'activité enzymatique intense de ces bactéries libère beaucoup de gaz.

Toutes ces espèces de *Clostridia* sont présentes dans les sols sous leur forme sporulée résistante, mais elles se rencontrent également dans les eaux et les sédiments. À l'occasion de blessures profondes ayant été souillées avec de la terre (blessés de guerre, accidentés...), des bacilles ou des spores sont introduits dans la plaie ; dans certaines conditions (dont l'anaérobiose), les bacilles ou les spores après germination et production de bacilles pourront proliférer, élaborer leurs toxines qui iront exercer leur action néfaste dans l'organisme.

Ces *Clostridia* sont également des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, qui peuvent être à l'origine d'une gangrène gazeuse lors d'une contamination chirurgicale.

Des mesures prophylactiques adaptées (désinfection des plaies, antibiothérapie...) permettent de prévenir les gangrènes gazeuses.

2.2.3. Clostridium perfringens

Clostridium perfringens est un gros bacille à bouts carrés, capsulé et immobile, capable de sporuler. Il est :

- ubiquitaire (sols, eaux douces superficielles, vases, boues ;
- également commensal des cavités naturelles de l'homme et de l'animal (voies respiratoires, intestin).

Cl. perfringens est une espèce pathogène pour l'homme et les animaux avec ses six types toxinogènes :

- les types A1 et C sont agents d'infections diverses chez l'Homme (gangrènes gazeuses, septicémies...) ;
- le type A2 est responsable de toxi-infections alimentaires individuelles (Tia) ou collectives (Tiac) apparaissant 6 à 12 heures après l'ingestion d'aliments fortement contaminés (viandes mal cuites...) (voir paragraphe 3.2.2) ;
- les types B, D et E sont les agents d'infections chez les animaux (agneaux, moutons...).

Chaque type toxinogène produit une ou plusieurs toxines majeures létales, mineures ou non létales (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997).

2.2.4. *Clostridium tetani*

Clostridium tetani est un bacille à Gram +, à spore terminale déformante (« forme en épingle ») ; elle est ubiquitaire sous forme sporulée (sols, déjections animales...), mais elle est aussi commensale du tube digestif des animaux (bovins, équidés...).

Lorsque qu'un individu présente une plaie cutanée (même bénigne) souillée par de la terre, des bacilles ou des spores sont introduits dans cette plaie. Si des conditions d'anaérobiose sont réunies, les bacilles ou les spores ayant germé en donnant des bacilles vont se multiplier dans la plaie ; puis, les bacilles vont produire des toxines (dont une exotoxine protéique), qui vont se disséminer dans la circulation générale. Après une période d'incubation de 4 à 21 jours, les symptômes du tétanos apparaîtront chez une personne non vaccinée (contractures, spasmes musculaires, convulsions...) (Antona, 2002).

 Pour plus d'informations : voir paragraphe 3.2.3.

2.2.5. *Clostridium difficile*

Clostridium difficile, contrairement aux espèces précédentes d'origine tellurique est une bactérie commensale de l'intestin des nouveau-nés et d'adultes porteurs sains. Elle produit deux toxines A et B qui la rendent pathogène ; elle est l'agent :

- de colites pseudo-membraneuses (CPM) des muqueuses du côlon et du rectum, consécutives à un traitement antibiotique, s'exprimant par des diarrhées associées à d'autres signes cliniques ;
- de diarrhées post-antibiothérapie, moins sévères que les CPM.

Ce germe est la première cause de diarrhées nosocomiales de l'adulte (95 % des cas de CPM et 25 % des diarrhées post-antibiotiques) (Girault *et al.*, 2004).

2.3. Clostridia sulfitoréducteurs

Ils regroupent des espèces de *Clostridia* telles que *Cl. perfringens*, *Cl. bifementans*, *Cl. sporogenes*, *Cl. novyi*, *Cl. fallax*, *Cl. septicum*... Ils sont ainsi dénommés car ils sont capables de réduire les sulfites (sulfite de sodium, par exemple) présents dans le milieu de culture en sulfures ; ceux-ci se combinent avec un sel de fer pour donner du sulfure de fer noir. Les colonies noires entourées d'un halo noir sont caractéristiques de bactéries sulfitoréductrices (ou anaérobies sulfitoréducteurs), de *Clostridium* ou de *Cl. perfringens* après confirmation selon les conditions de recherche.

► SURVEILLANCE DANS LES ALIMENTS, LES EAUX ET LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

Voir paragraphe 3.1.

3. ■ Surveillance et épidémiologie

Dans le chapitre 1, lire les paragraphes 5 et 6.

3.1. Surveillance

3.1.1. Dans les aliments

3.1.1.1. Historique

Dans certains aliments, ces espèces de *Clostridium* ont été jusqu'en 2005 des germes indicateurs de contamination fécale, conformément à la note de service DGAL/SDHA/N2001-8090 du 27 juin 2001 émanant de la Direction générale de l'alimentation (voir tableau 47).

Tableau 47. Recherche des anaérobies et des *Clostridia* sulfitoréducteurs dans certains types d'aliments.

Type d'aliment	Anaérobies sulfitoréducteurs	<i>Clostridia</i> sulfitoréducteurs	<i>Clostridium perfringens</i>
Viandes prélevées en abattoirs		Oui	
Viandes de boucherie, gibiers, sang d'animaux..., graisses animales, produits transformés à base de viandes	Oui à 46 °C	* Oui	

Tableau 47. suite

Type d'aliment	Anaérobies sulfitoréducteurs	<i>Clostridia</i> sulfitoréducteurs	<i>Clostridium perfringens</i>
Viandes de petits gibiers d'élevage, de ratites et de certains de leurs produits	Oui à 46 °C		
Foie gras... pièces de découpes crues de volailles...			Oui
Produits de la pêche (crustacés, poissons...) ; escargots et plats cuisinés	Oui à 46 °C		
Pâtisseries et crèmes pâtisseries	Oui à 46 °C		
Semi-conserves	Oui à 46 °C		
Gélatines	Oui		Oui
Hydrolysats de protéines	Oui à 46 °C		
Aliments lactés		Oui à 46 °C	Oui
Aliments diététiques	Oui à 46 °C		
Produits végétaux crus... ¹			Oui

Le « oui » utilisé dans ce tableau indique le type de recherche demandé pour cet aliment ; les normes microbiologiques exigibles pour ces germes sont données dans ce document.

1. N'apparaissent plus dans la note de service DGAL du 27 juin 2001.

3.1.1.2. Depuis le 1^{er} janvier 2006

En fait, d'après le nouveau règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission des Communautés européennes du 15 novembre 2005 et son application française au 1^{er} janvier 2006, les anaérobies sulfitoréducteurs à 46 °C, les *Clostridia* sulfitoréducteurs et *Clostridium perfringens* n'entrent ni dans les critères de sécurité des denrées alimentaires, ni dans les critères d'hygiène des procédés (voir chapitre 1, paragraphe 5.1.2).

Le règlement (CE) n° 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires n'apporte aucun élément relatif à ces germes.

3.1.2. Dans les eaux

Dans les eaux, ces espèces de *Clostridium* sont des germes indicateurs de contamination fécale depuis plusieurs décennies (Delarras et Trébaol, 2003).

Cl. perfringens, espèce la plus spécifique parmi les *Clostridium* sulfitoréducteurs, germe ubiquiste est notamment considéré comme un indicateur de

malpropreté au niveau du réseau de distribution d'eau potable. D'ailleurs, dans la directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998, le paramètre *Clostridium perfringens* fait partie des paramètres indicateurs microbiologiques de contrôle des eaux destinées à la consommation humaine. Mais, il n'a pas été repris dans le décret n° 2001-1220, où il a été remplacé par le paramètre général bactéries sulfitoréductrices (voir Delarras *et al.*, 2010).

3.1.3. Dans les produits pharmaceutiques

La surveillance est réalisée conformément à la *pharmacopée européenne*.

3.2. Épidémiologie

3.2.1. Botulisme

Les bactéries anaérobies et les souches de *Clostridium botulinum* sont adressées au « CNR des bactéries anaérobies et botulisme », installé dans l'Unité des toxines et pathogénie bactérienne à l'Institut Pasteur de Paris.

3.2.1.1. Botulisme humain

► ANNÉE 1997 (AU CANADA)

Un aperçu pour l'année 1997 sur le botulisme au Canada (Austin *et al.*, 1999) indique que 7 foyers de botulisme de type E (18 cas) ont été enregistrés dans le Relevé des maladies transmissibles au Canada (RMTC). *Clostridium botulinum* de type E a été retrouvé ou suspecté dans des aliments inuits fermentés traditionnels (phoque igunaq, chair de béluga, graisse de caribou, saumon fumé...).

► ANNÉES 1998-2000 (EN FRANCE)

Une étude épidémiologique de Carlier *et al.* (2001) sur le botulisme en France entre 1998 et 2000 permet de mieux cerner le botulisme humain et animal.

Le nombre de foyers de botulisme humain a été de 14 (avec 16 cas) en 1998, de 19 foyers (avec 26 cas) en 1999 et de 12 foyers (14 cas) en 2000. Les foyers de botulisme avec analyses des aliments suspects ont révélé, dans certains cas, l'origine du botulisme :

- jambon séché de préparation familiale : botulisme de type B (5 foyers en 3 ans), le plus fréquent en France et en Europe, associé notamment à la consommation de charcuteries, de jambon non cuit ;
- soupe industrielle de poisson : botulisme de type A (1 foyer en 3 ans), associé en général à des conserves de végétaux souillés par de la terre ;
- suspicion de boudin industriel : botulisme de type AB (1 foyer en 3 ans) ;

- suspicion d'une marinade de poisson de préparation familiale : botulisme de type E (2 foyers en 3 ans), associé dans les régions nordiques de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, parties nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon) aux poissons fumés ou fermentés et autres produits de la mer.

Même si le botulisme est une maladie rare en France, la surveillance s'impose au niveau alimentaire compte tenu de l'apparition des nouvelles générations de conservation des aliments, des échanges commerciaux avec d'autres pays...

► ANNÉES 2007-2009 (EN FRANCE)

Selon le rapport de Mazuet *et al.* (2011) sur le botulisme humain en France entre 2007 et 2009, 22 foyers de botulisme confirmé impliquant 45 personnes ont été identifiés et 2 foyers (2 cas) ont été cliniquement suspectés pendant cette période.

Le botulisme était en majorité de type B (31 cas) et plus rarement de type A (8 cas) ou E (3 cas). L'origine du botulisme était alimentaire dans 89 % des cas, parfaitement identifiée dans 7 foyers (jambon dans 4 foyers, terrine de sanglier, confiture familiale de potiron et produit industriel « enchilladas ») et fortement suspectée dans 2 autres (terrines de sanglier et poisson fumé sous vide).

« Bien que rare, le botulisme est toujours présent en France avec des formes inhabituelles et graves qui justifient le maintien de sa surveillance ».

► ANNÉE 2011

D'après les communiqués de presse émanant du ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé (DGS, DGCCRF...) des 6 et 7 septembre 2011, 2 foyers groupés de botulisme (représentant 8 cas au total) ont été identifiés dans les départements du Vaucluse et de la Somme. L'enquête conduite par les autorités sanitaires montra qu'une conserve de tapenade d'olive verte aux amandes produite par l'établissement X (le nom de l'entreprise ainsi que les marques des produits distribués sont citées). Par ailleurs, les analyses réalisées sur d'autres conserves du même établissement ont également révélé la présence, soit du germe *Clostridium botulinum*, soit de la toxine botulinique.

En conséquence, les autorités sanitaires ont demandé à l'entreprise concernée de retirer de la vente toutes les conserves fabriquées dans son établissement. Par ailleurs, toutes les conserves déjà vendues devaient être rapportées par les consommateurs au lieu d'achat ou dans les DDPP.

► ANNÉE 2013

Selon le communiqué de presse du 22 février 2013 de la DGCCRF, un rappel de conserves fabriquées par une entreprise X des Bouches-du-Rhône, susceptibles de présenter un danger pour la santé des consommateurs a été lancé, suite à la détection de *Clostridium botulinum*. Le nom de l'entreprise ainsi que les marques des produits distribués sont citées (www.economie.gouv/dgccrf).

En effet, une enquête réalisée par la DGCCRF a mis en évidence la présence de cette bactérie dans des préparations de « tapenade noire », de « confiture d'olive noire », d' « olivade à l'anchois », d' « anchoïade », de « pistou rouge », de « tian de pois chiche », de « tartinad' pois chiche », de « tian de fenouil ». Ces préparations présentaient un défaut de maîtrise du procédé de pasteurisation pouvant permettre le développement de *Clostridium botulinum* et la production de la toxine botulinique.

3.2.1.2. Botulisme animal

► ANNÉES 1998-2000 (EN FRANCE)

Le CNR a détecté pour la période 1998-2000 des foyers de botulisme animal chez des bovins, des oiseaux d'élevage, des oiseaux sauvages, des animaux tels que le chien, le sanglier, le chevreuil, le vison. Les types C et D sont les plus fréquemment rencontrés, et parfois le type E ; ainsi, au cours de l'hiver 1997-1998, dans le Pas de Calais, des mouettes ont contracté le botulisme de type E, après s'être nourries, semble-t-il, sur une décharge de déchets de poissonneries (Carlier *et al.*, 2001).

Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPPF, 2000) a rendu un avis relatif à la levée d'interdiction de la pêche de loisirs dans le lac de Créteil paru au Bulletin officiel de la DCCRF (n° 11 du 18 octobre 2000). Une interdiction avait été prise concernant la pêche dans ce lac, suite à la détection d'une mortalité anormale d'oiseaux victimes d'un botulisme de type C. Par ailleurs, des analyses avaient révélé la présence de spores et de toxines botuliniques de type B, D et E dans les poissons du lac. Les cas humains de botulisme à *Cl. botulinum* de type C sont très rares et n'ont jamais été rapportés à une ingestion de poisson (dix cas signalés dans la bibliographie depuis 1953 dont six seraient liés à une origine alimentaire).

3.2.2. Tiac à *Clostridium perfringens*

Les *Clostridia* sulfitoréducteurs dont *Cl. perfringens* faisaient partie des critères microbiologiques applicables aux aliments et ils étaient donc recherchés par les professionnels de l'agroalimentaire et par les services de l'état compétent (voir tableau 47).

► ANNÉES 1996 À 2005

Il ressort des études épidémiologiques sur les toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) en France en 1999 et 2000 (Haeghbaert *et al.*, 2002) et en 2001 (Haeghbaert *et al.*, 2002) que :

- 27 foyers (792 cas) de Tiac à *Cl. perfringens* ont été déclarés aux Ddass et DDSV en 1999 et 2000 ;
- 8 foyers (208 cas) de Tiac à *Cl. perfringens* ont été déclarés en 2001.

Pour les Tiac déclarés en 2001, les aliments responsables ou suspectés ont été des viandes (11 foyers), des produits de charcuterie (4), des volailles (6), des poissons et crustacés (1), des aliments d'origine non animale ou mixte (13), des aliments non retrouvés (12). Des plats et viandes en sauce ont été fréquemment incriminés pour ces Tiac à *Cl. perfringens*, observation déjà mentionnée dans l'étude épidémiologique 1999-2000.

Les foyers à *Cl. perfringens* confirmé ou suspecté se retrouvent dans tous les lieux de contamination habituellement rencontrés dans les Tiac (le milieu scolaire, les restaurants d'entreprises, les institutions médico-sociales (hôpitaux, maisons de retraite, crèches, centres d'aide par le travail, maison d'accueil spécialisée (MAS), la restauration commerciale, les autres collectivités (centres de loisirs, prisons, banquets, casernes militaires), les foyers familiaux et des foyers diffus).

D'après le bilan effectué sur les Tiac en France entre 1996 et 2005 par Delmas *et al.* (2006), il apparaît que *C. perfringens* a été mis en cause dans 136 foyers (5,1 %) représentant 5 375 cas (16,2 %) ; de surcroît, ce germe est suspecté dans 383 foyers (18,5 %) regroupant 8 956 cas (28,8 %). Parmi les aliments incriminés et identifiés, figurent au premier les viandes et au dernier rang l'eau de boisson (2 foyers).

► ANNÉES 2006 À 2008

Selon le rapport de Delmas *et al.* (2010) sur les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008 :

- 58 foyers confirmés à *Clostridium perfringens*, soit 7 % des foyers de Tiac, ont été déclarés aux Ddass ou DDSV ; ils représentent 1 540 cas, soit 16,7 % (0 décès) des cas de Tiac ;
- 107 foyers suspectés à *Clostridium perfringens*, soit 9,2 % ont également été déclarés, regroupant 2143 cas (soit 17,7 %).

Il apparaît que la restauration collective est marquée par les foyers causés par *Bacillus cereus* ou *Clostridium perfringens* (23 % des foyers sont survenus en restauration collective).

Dans la rubrique « Autres pathogènes », sont signalés 2 foyers regroupant 5 cas de *Clostridium botulinum*.

► TIAC À CLOSTRIDIUM PERFRINGENS LIÉES À LA CONSOMMATION DE COQUILLAGES MARINS

Voir chapitre 15, paragraphe 3.1.3.2.

3.2.3. Tétanos

► ANNÉES 1946 À 2001

Selon une étude épidémiologique effectuée sur le tétanos en France de 1946 à 2001 (Antona, 2002), il apparaît que le taux d'incidence de cette

maladie à déclaration obligatoire n° 20 (DO) est passé de moins de 10 cas par million d'habitants en 1946 à des valeurs de 0,49 et 0,44 en 2000 et 2001 respectivement.

► ANNÉES 2002 À 2004

D'après la dernière enquête effectuée (Antona, 2006), 67 cas de tétanos ont été déclarés entre 2002 et 2004, avec un taux d'incidence de 0,28, 0,50 et 0,33 par million d'habitants respectivement pour 2002, 2003 et 2004. Le tétanos concerne principalement des personnes âgées et plus souvent les femmes que les hommes.

► ANNÉES 2007 À 2009

D'après le rapport d'Antona (2008) sur « le tétanos en France en 2005-2007 », 41 cas de tétanos généralisé, les seuls cas à déclaration obligatoire (DO), ont été notifiés aux autorités sanitaires : 17 en 2005, 16 en 2006 et 8 en 2007, avec un taux d'incidence des cas déclarés respectivement de 0,28, 0,26 et 0,13 par million d'habitants.

Selon l'auteur du rapport, tous ces cas et ces décès (13, soit 32 % des cas) auraient pu être évités par une meilleure application de la politique des rappels antitétaniques et, en cas de plaie, par la vaccination et l'administration d'immunoglobulines spécifiques humaines selon le protocole recommandé.

Ce sont les blessures qui ont constituées la porte d'entrée du bacille dans 68 % des cas et les plaies chroniques dans 10 % des cas ; pour les 22 % des cas restants, la porte d'entrée est passée inaperçue.

► ANNÉES 2008 À 2011

D'après le rapport d'Antona (2012) sur « le tétanos en France entre 2008 et 2011 », 36 cas de tétanos généralisé ont été déclarés par les médecins aux ARS avec une létalité de 31 % (11 des cas).

Les cas de tétanos concernent principalement des personnes âgées (86 % ont 70 ans ou plus) et des femmes (75 %). Toutes ces personnes étaient non ou mal vaccinées. Les conseils donnés par l'auteur du rapport sont les mêmes que ceux donnés dans le rapport précédent.

4. ■ Caractères principaux des *Clostridia*

Les caractères principaux, les milieux de culture et l'identification biochimique présentés dans le tableau 48, se rapportent principalement aux espèces de la famille des *Clostridiaceae* (Bergey's manual, 2004).