

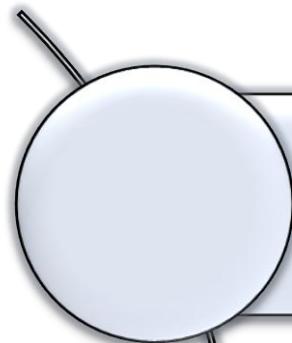
Master: Agroalimentaire et contrôle de qualité
Master: Microbiologie appliquée

UEF4:
Méthodes moléculaires et contrôle de
qualité
« Techniques de contrôle moléculaire »

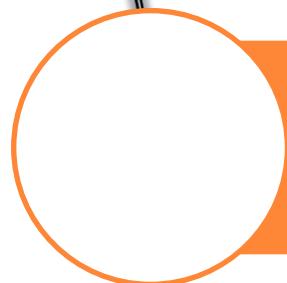


Dr Alioua S
2019/2020

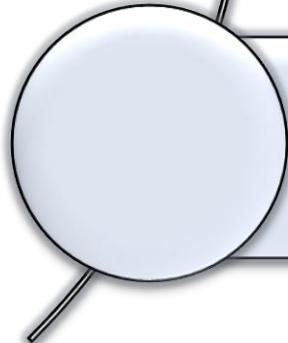
PROGRAMME



Chapitre 1: Rappel sur les différents microorganismes responsables des toxi-infections alimentaires



Chapitre 2: Analyses immunologiques



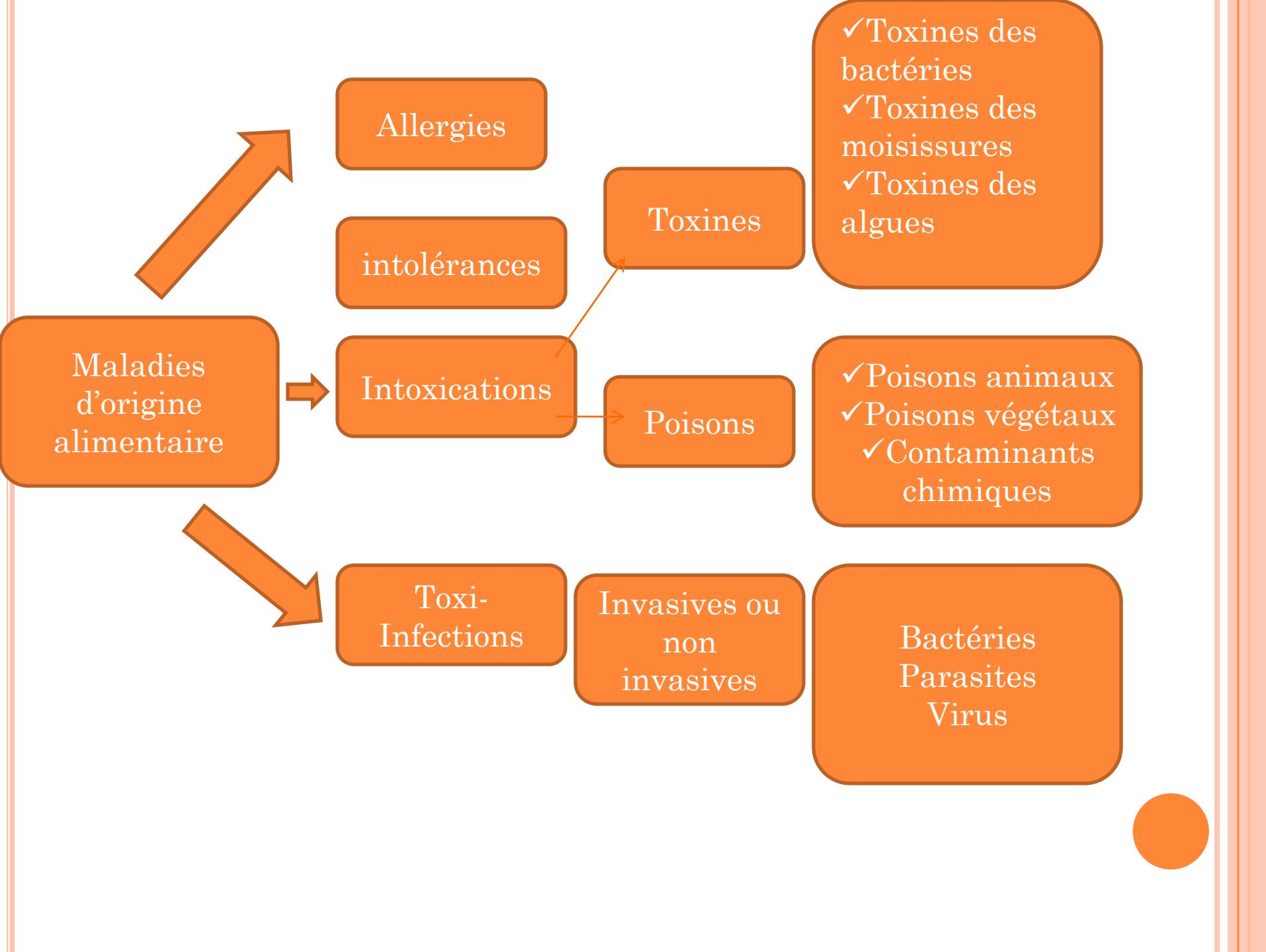
Chapitres 3: techniques d'hybridation moléculaire et technique PCR



CHAPITRE 01

**Microorganismes responsables
des toxi-infections alimentaires**





TOXI-INFECTIOON ALIMENTAIRE

- Maladie souvent infectieuse et accidentelle, contractée suite à l'ingestion d'aliments ou de boisson contaminées par des agents potentiellement pathogènes.
- Les T.I.A bactériennes, représentent la majorité des cas recensés.



AGENTS DES TOXI-INFECTIONS

Bactéries

- *Salmonella*
- *Listeria monocytogenes*
- *Shigella spp.*
- *Vibrio cholerae parahaemolyticus*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Clostridium perfringens, botulinum*
- *Staphylocoques aureus*
- *Bacillus cereus*
- *Brucella spp.*
- *Campylobacter jejuni*
- *Coxiella burnetii*
- *Escherichia coli,*



Parasites

- Plathelminthes (Taenia)
- Vers (Trichinella, Anisakis)
- Protozoaires (Giardia,Cryptosporidium, Toxoplasma gondii, Cyclospora, Fasciola hepatica)

Virus

- Norovirus
- Rotavirus
- L'hépatite A
- L' hépatite E



- L'investigation épidémiologique et microbiologique des infections alimentaires met en évidence que certains aliments sont associés à une contamination plus fréquente que d'autres, et par conséquent avec un risque accru de survenue de pathologie.
- Ces aliments dits « à risque » sont ceux à base de produits crus (lait cru, dérivés et fromages au lait cru) ou consommés crus (fruits de mer, oeuf cru, mayonnaise, mousse au chocolat) ou peu cuits (viande peu cuite).
- Le risque de maladie et surtout sa gravité est par ailleurs augmenté chez les personnes aux moyens de défense altérés vis-à-vis des processus infectieux, qu'il s'agisse de la personne âgée ou du sujet immuno-incompétent ou encore en situation d'hospitalisation en structure de long séjour.

Cette contamination peut avoir eu lieu lors de diverses étapes : de la production jusqu'à la conservation de l'aliment.

- De multiples micro-organismes (bactéries, virus, parasites) ou leurs toxines sont susceptibles de contaminer les denrées alimentaires et d'engendrer diverses pathologies. Les mesures mises en œuvre par les autorités sanitaires ont permis une diminution importante du nombre de toxi-infections liées à l'alimentation.
- Il convient toutefois de rester vigilant car le risque de contamination des aliments peut survenir à n'importe quelle étape du processus alimentaire, de la fourche à la fourchette



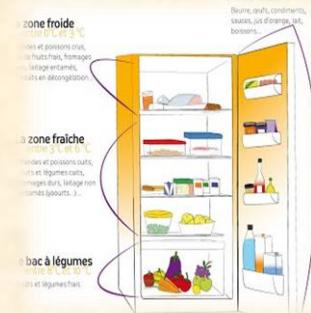
survient généralement
après l'ingestion de:



**Aliment frais non lavé ou lavé
avec de l'eau souillée.**



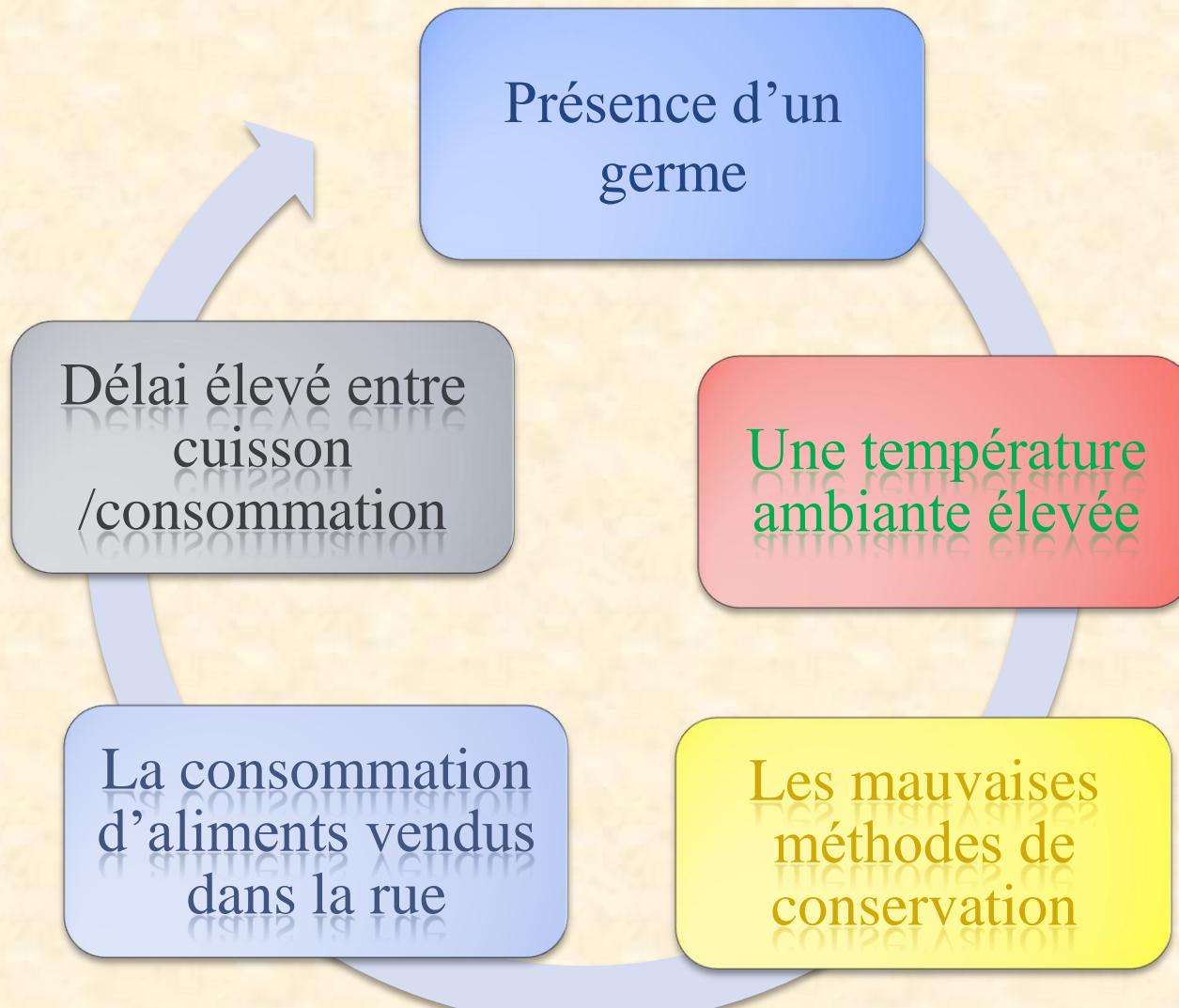
**Aliment mal conservé ou dont la
chaîne du froid n'a pas été
respectée.**



Aliment mal ou non cuit.



Facteurs influençant l'apparition d'une toxi-infection alimentaire



Physiopathologie

Trois mécanismes principaux sont responsables de l'activité pathogène des agents responsables des TIA:

Action invasive : par colonisation ou ulcération de la muqueuse intestinale avec inflammation. La localisation est habituellement iléo -colique et la destruction villositaire est importante. Les selles sont alors glaireuses, riche en polynucléaires, parfois sanguinolentes.

Action cytotoxique : avec production d'une toxine protéique entraînant une destruction cellulaire.

Action entérotoxinogène : entraînant une stimulation de la sécrétion intestinale.

TRANSMISSION

- Les travailleurs malades qui manipulent la nourriture (une des sources de contamination les plus répandues transmise par voie alimentaire)
- L'eau contaminé peut servir dans quelque cas de vecteur (Shigelles, Salmonelle, Hepatite A...)
- La souillure de la nourriture par des animaux nuisibles (vecteurs)
- Consommation involontaire de substances naturelles toxiques (champignons veineux)



SYMPTÔMES

- Débutent plusieurs heures à plusieurs jours après l'ingestion (phase d'incubation)
- Comprend un ou plusieurs troubles selon l'agent en cause:
 - Fatigue et / ou maux de tête
 - Nausées et / ou Vomissements
 - Douleur abdominale
 - Dysenterie
 - Fièvre



RISQUES LIÉES À LA CONSOMMATION DE L'EAU



L'EAU

- Aujourd'hui en raison de l'augmentation des besoins, l'eau destinée à l'usage alimentaire provient autant des **eaux superficielles** que des **eaux souterraines**, ce qui augmente les risques de pollution microbienne et nécessite des traitements complexes et couteux
- Les **systèmes d'épuration** des eaux usées et les contrôles microbiologiques effectuées sur les sources d'eau pour usage alimentaire préviennent normalement toutes présence de microorganismes pathogènes dans l'eau d'alimentation



- Cependant, des contaminations fécales peuvent se présenter à la source ou à un endroit quelconque du système de distribution de l'eau
- Elles peuvent aussi survenir accidentellement dans le produit fini à la suite d'un traitement insuffisant



MICROORGANISMES PATHOGÈNES SUSCEPTIBLES D'ETRE RENCONTRÉS DANS LES EAUX D'ALIMENTATION



Salmonella
Shigella
Vibrio cholerae

Responsable dans le passé de grands fléaux épidémiques ou endémiques

Disparition dans les eaux traités et désinfectés

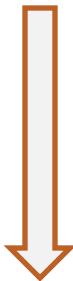
Agents responsables de gastroentérites ou de diarrhée banales

Salmonella mineurs,
Vibrio autre que Cholera
E. coli
Yersinia enterolitica
Campylobacter jejuni



N.B

D'autres bactéries dites **opportunistes**



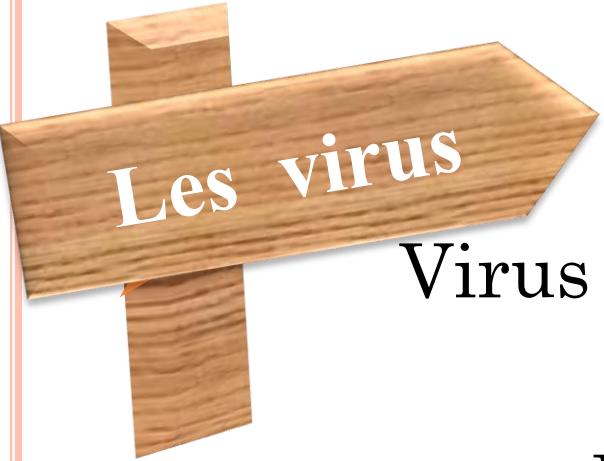
Ps aeruginosa

Aeromonas



*Manifestations digestives chez les
immunodéprimées*





Les virus

Virus de l'hépatite A



Hépatite A

Rota virus Adénovirus Entérovirus



Gastroentérites et diarrhées

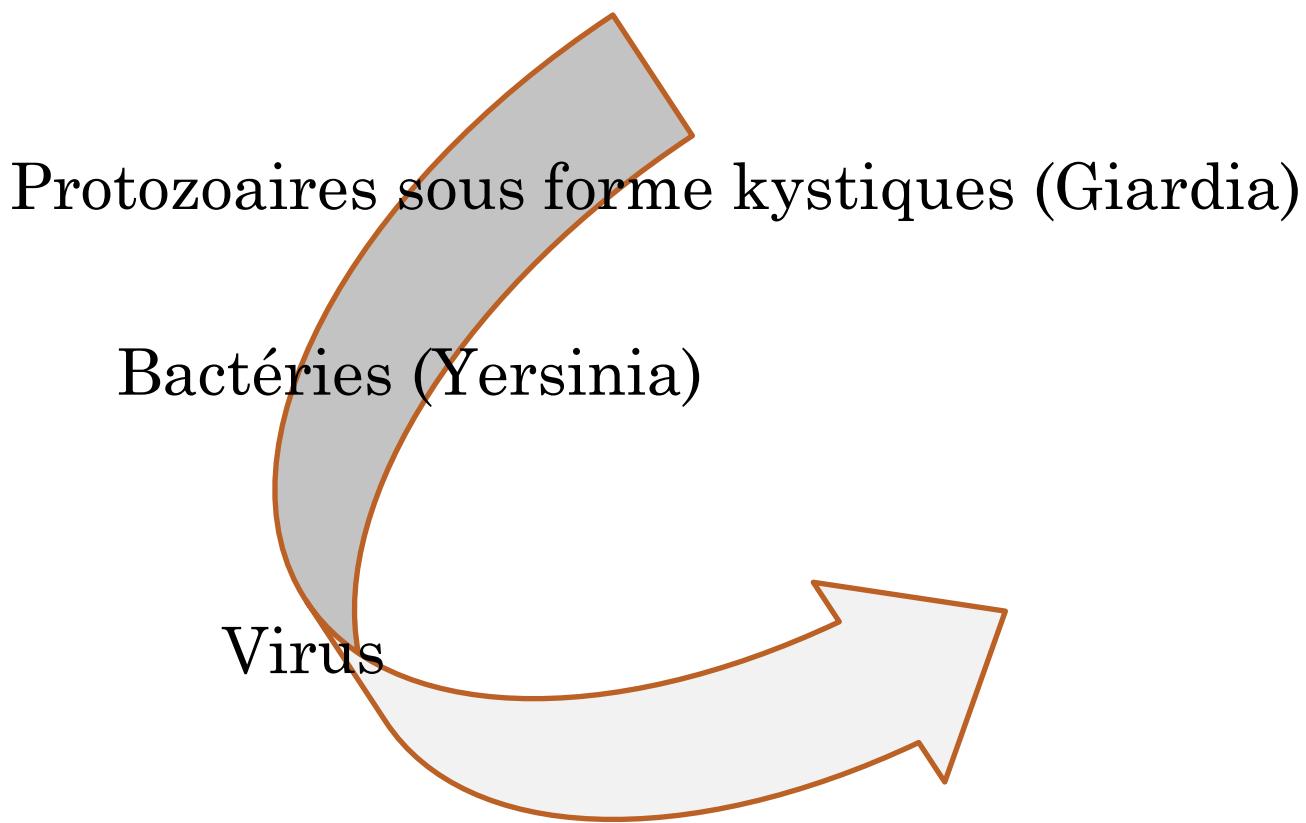


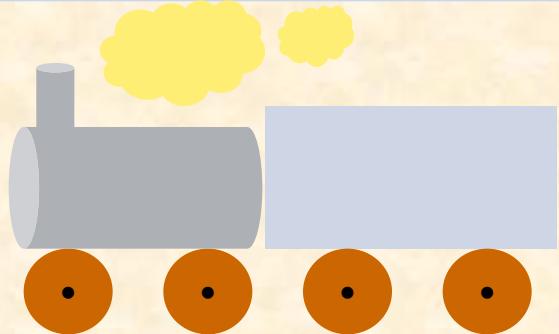
Les parasites

Entamoeba histolytica → Dysentéries amibienne

Giardia lamblia → Diarrhées prolongés

- La survie de ces microorganismes dans l'eau est variable





Les principaux germes responsables

1- Germes pathogènes (invasives)

Ceux qui agissent directement sur la muqueuse par adhésion, pénétration (invasives): *salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter*...



le germe lui-même qui est toxique

2- Germes toxinogènes

Ceux qui agissent par l'intermédiaire d'une toxine: *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*



le germe reste dans l'intestin,
mais c'est sa toxine qui est
toxique

TOXI-INFECTION À BACTÉRIE PATHOGÈNE (INVASIVES)



Entérobacteriaceae

Gram (-)

An/aérobie (facultative)

Catalase (+) / Oxydase (-)

pH < 4 (sensible)

4C° (croissance faible)

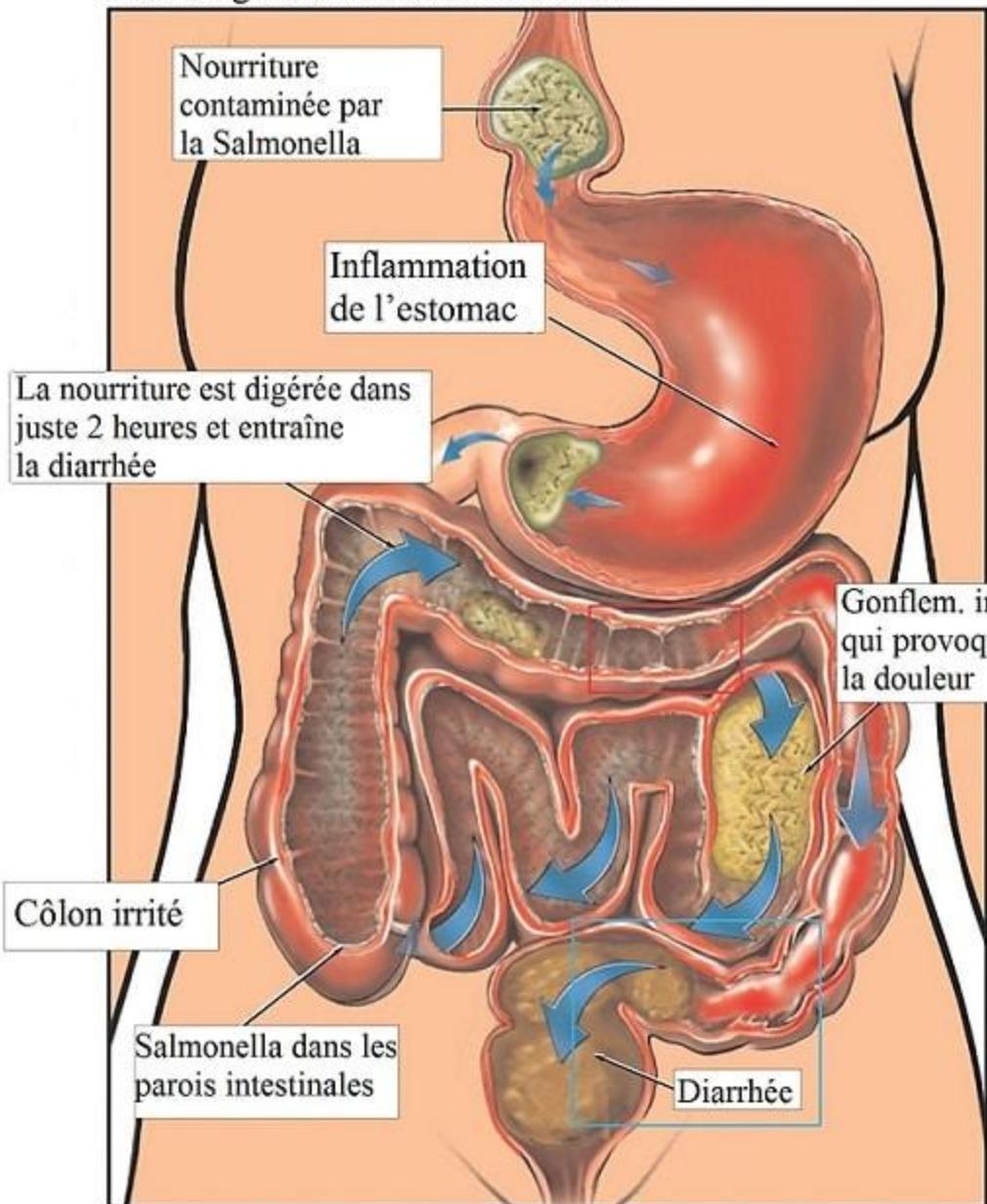


Salmonella Sp

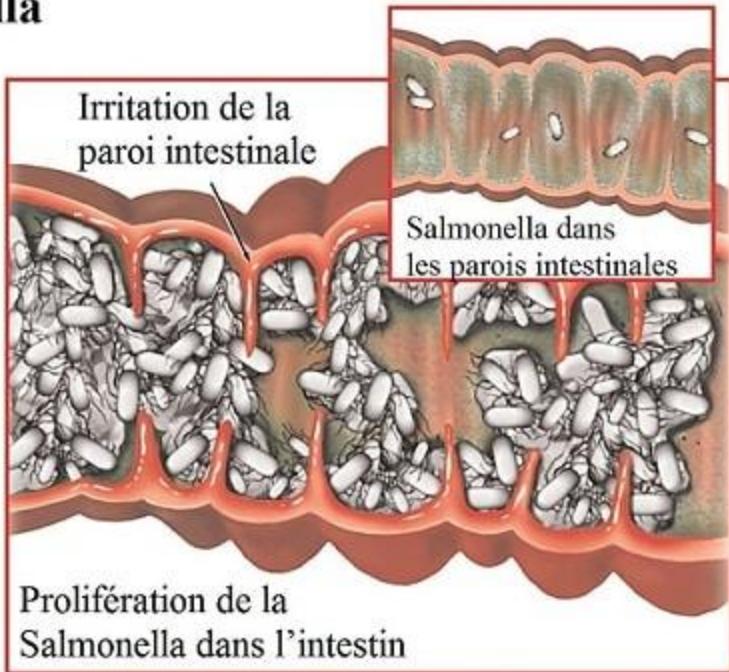
→ **Salmonellose (TIAC)**
Fièvre typhoïde
Fièvre paratyphoïde

Infection à Salmonella

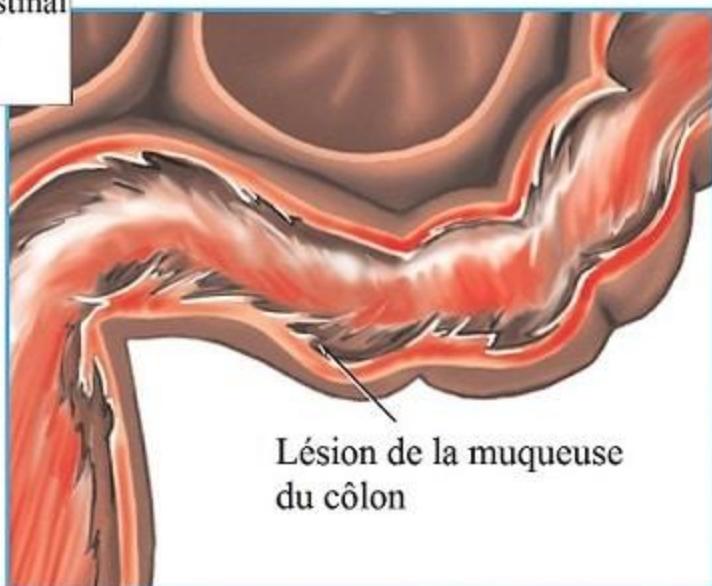
Motilité gastro-intestinale anormale



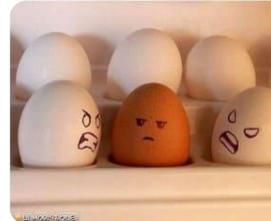
Irritation de la paroi intestinale



Côlon descendant sigmoïde



* Œufs et préparations à base d'œufs non ou peu cuits.



* Aliments préparés souillés et mal conservés.



* Viande insuffisamment cuite, dont volaille.



* Poissons ou fruits de mer peu cuits.



* légumes crus contaminés.



* pâtisserie à crème.



* coquillages.



* laitages.



* pâté.



Symptômes



vomissements



douleurs abdominales



Forte fièvre accompagnée
de frissons et maux de tête,



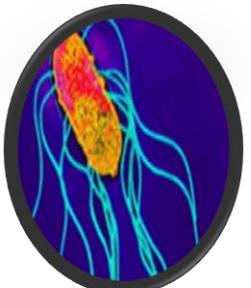
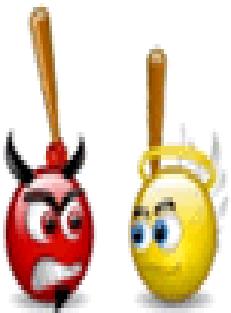
Diarrhée



2 à 3 j, parfois
plus.



Prévention



lutter contre la transmission des sérotypes à l'origine de la fièvre

elle est recommandée en cas de voyage dans une zone endémique

Avec une efficacité de l'ordre de 60 à 70 % et ne conférant aucune protection contre S.paratyphi

il est important de rappeler que tous les cas de fièvre typhoïde

doivent systématiquement faire l'objet d'une déclaration obligatoire



Entérobacteriaceae

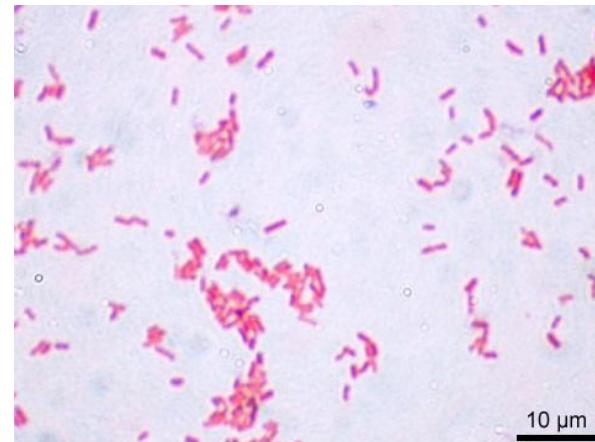
Gram (-)

An/aérobie (facultative)

Désaminase (-)

Fermente glucose

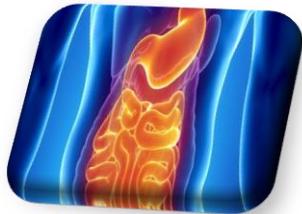
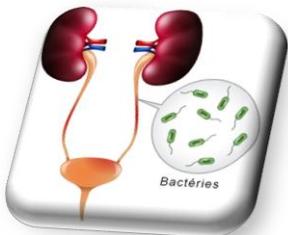
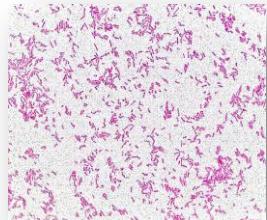
80% flore intestinale



Escherichia coli

Les souches d'*E. coli* inductrices de diarrhées peuvent être classées en cinq pathovars :

→ *E. coli* entérotoxigéniques, *E. coli* entéroinvasives, *E. coli* entéropathogènes, *E. coli* entérohémorragiques .



Aliments



Haché de
bœuf
insuffisamment cuit



graines germées



fromage au lait cru.



Fruits et légumes crus



(p) d'origine végétale non pasteurisés



lait cru



- Enterobacteriaceae
- bacilles Gram négatifs
- Immobile



YERSINIA

- responsables de **la peste** (yersinioses entériques).
- parmi lesquelles *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*



Campylobacteraceae

- bactéries Gram négatif
- microaérophiles
- oxydase positive
- non sporulantes
- *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*) sont à l'origine de manifestations cliniques variées (les entérites....)



Campylobacter



MÉCANISME :

- Les bactéries à action directe adhèrent puis pénètrent dans les cellules intestinales.
- Elles sont dotées de facteurs de virulence codés par des gènes chromosomiques et/ou plasmidiques qui leur confèrent ces propriétés invasives.



Deux processus peuvent se développer :

✓ soit la bactérie détruit la cellule et est alors responsable d'une T.I.A. se manifestant par une réaction inflammatoire locale importante avec diarrhée infectieuse fébrile et présence de sang et de leucocytes dans les selles ;



✓ soit elle reste confinée et se multiplie dans les vacuoles sans en lyser les membranes. Elle est alors à l'origine, à l'intérieur de la cellule, d'une cascade de réactions responsable d'une diarrhée fébrile éventuellement accompagnée de vomissement (gastro-entérite).

SYMPTÔMES

- Ils n'apparaissent que dans la mesure où la bactérie s'est développée dans l'aliment, qu'elle a survécu dans le tube digestif et qu'elle est arrivée sur son site d'action en **quantité suffisante**.
- Les symptômes (vomissements, fièvre, diarrhée) surviennent d'autant **plus vite que l'inoculum est important**.



TOXI-INFECTION À BACTÉRIE TOXINOGÈNES



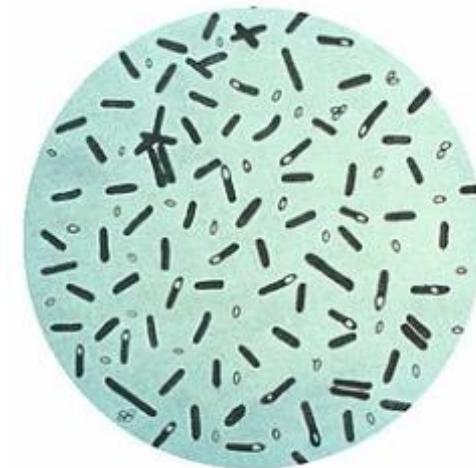
Clostridiaceae

Gram (+)

Anaérobie (stricte)

Sporulé

Toxine thermolabile



Clostridium botulinum



Botulisme (toxine botulique ou botulinique)



- L'intoxication botulinique, seule TIAC à symptômes nerveux.
- L'incubation habituelle est de 12 à 24 h, mais peut s'étaler de 2 h à 8j. Plus c'est rapide, plus c'est grave.
- Paralysies motrices & sécrétoires (inhibition des neurones moteur de la contraction musculaire).
- Premiers muscles touchés : ceux des yeux, et les fibres lisses.



Clostridiaceae

Gram (+)

Anaérobie (stricte)

Sporulé

Spores faiblement

thermorésistantes

Immobile

Gazogène (H_2S) et réduction sulfite

Toxine thermolabile détruite dans l'estomac



Clostridium perfringens

→ Gangrène gazeuze (toxine α)
Entérite nécrosante (nécrotoxines)

Staphylococcaceae

Gram (+)

Coques en amas

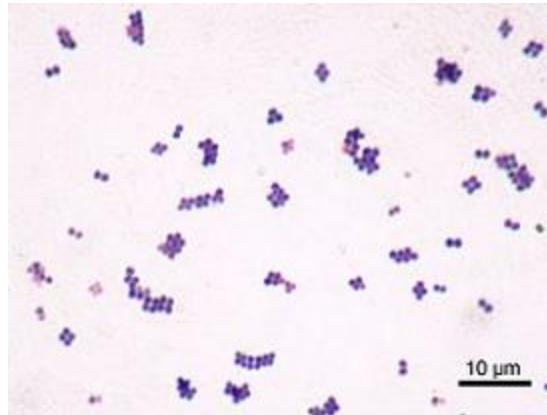
An/aérobie (facultative)

Catalase (+)/ oxydase (-)

pH > 4,

Croissance jusqu'à 20% NaCl

Fermente le mannitol



Staphylococcus aureus



Intoxication alimentaire (entérotoxine)



Bacillaceae

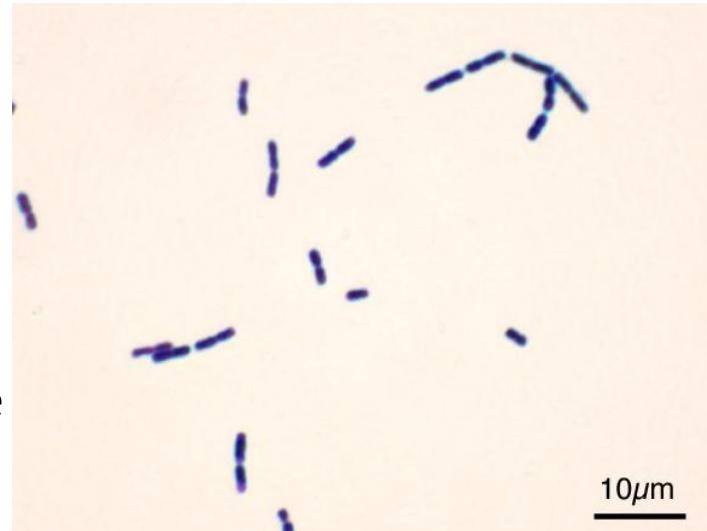
Gram (+)

Bacille sporulé

An/aérobie (facultative)

Mobile

**Deux types de toxine :thermostable
et thermolabile**

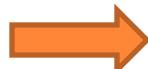


Bacillus cereus

Intoxication alimentaire :

Forme émétique (temps d'incubation 1 - 5h)

Forme diarrhéique (temps d'incubation 6 - 24h)



MÉCANISME

- Les **toxines bactériennes** responsables de T.I.A. sont des molécules **holoprotéiques** qui ont un impact direct sur le **métabolisme cellulaire**
- Les toxines staphylococciques agissent sur le **métabolisme de l'eau et des électrolytes** alors que la toxine botulinique a une affinité pour le système nerveux central. Les toxines donnent des **diarrhées liquides** plus ou moins importantes sans fièvre.
- La rapidité d'action des toxines **ne permet** généralement pas à l'organisme de **produire des anticorps** : même si l'on a pu détecter chez l'homme des antitoxines staphyloccocques, **leur valeur protectrice n'a jamais été démontrée**.

SYMPTÔMES

- Ils surviennent en général très vite après l'ingestion de l'aliment contaminé : après deux à quatre heures apparaît une diarrhée liquide très importante sans fièvre et sans manifestation invasive (pas de sang ni de leucocytes dans les selles).
- La diarrhée ne dure en général pas plus de vingt-quatre heures.



EPIDEMIOLOGIE DES T.I.A.

- L'épidémiologie des T.I.A. a surtout été bien étudiée en collectivité (toxi-infections alimentaires en collectivité = **T.I.A.C.**), où les **salmonelles sont prédominantes** : en 1997, les salmonelles étaient à l'origine de **76 %** des foyers de T.I.A.C. où l'agent a été identifié.
- Parmi les autres bactéries impliquées dans les T.I.A.C. on retrouve notamment ***S. aureus* (12 %)**, ***C. perfringens* (5 %)**.

SYMPTÔMES ASSOCIÉS AU MICROORGANISMES



1. Nausées et vomissement au 1^{er} plan

a. *Staphylococcus aureus*

Aliment en cause: Charcuterie, pâtisserie, laitage, glace

Transmission: humaine (cuisinier avec furoncle, panaris ou porteur sain)

Souche : entérotoxinogène

Incubation 1 à 6h

Vomissement puis diarrhée et douleur abdominale en 2^{ème} temps

Pas de fièvre

Il peut y avoir déshydratation importante et collapsus vasculaire

Durée des symptômes < 30 h



b. Bacillus cereus

Aliments souvent incriminés: viande, légumes, sauce, soupes, lait.

Deux formes cliniques:

Emétisante: la plus fréquente, apparition 1 à 6h après l'ingestion. Toxine préformée thermostable. Dure 10 h et guérit spontanément

Avec diarrhée: plus rare, due à la production d'une toxine thermolabile

Début 8 à 24 h après ingestion et dure 36 h au plus



2. Diarrhée sans fièvre élevée ni caractère hémorragique, due à des germes non invasifs:

Il s'agit de **diarrhée hydrique**, profuses, liée à une atteinte diffuse de l'intestin grêle **sans invasion tissulaire significative**

a. *Clostridium perfringens*

Présent dans **les aliments riches en protéines**

Souvent retrouvé en **restauration collective**, produit **deux toxines après son ingestion**:

Toxine A : incubation 6 à 24h

Diarrhée pendant 24h, nausée et fièvre dans 25% des cas, vomissement dans 10% des cas, crampe et maux de tête.

Toxine B : entérocolite nécrosante, souvent mortelle (pays du tiers monde)

b. Escherichia coli

Commensal du tube digestif chez l'homme, seul **certain stéréotype sont pathogènes :**

E.coli enterotoxinogène (ETEC): principale cause des **diarrhées infectieuses infantiles** dans les pays en voie de développement.

Transmission quand niveau d'hygiène bas, incriminée dans la **diarrhée des voyageurs**.

Production **d'une entérotoxine thermolabile**.

E.coli entéropathogène (EPEC): responsable des **gastroentérites infantiles**, autrefois sous forme d'épidémies dans les maternités et les crèches. Beaucoup plus rare aujourd'hui car progrès en hygiène. Reste une cause majeur de diarrhée infantile en Afrique, Asie et Amérique du sud.

Tableau clinique banal: **selles aqueuse** avec parfois du **mucus, fièvre, vomissement** parfois prolongé.

c. *Vibrio cholerae*

Prototype des diarrhée par **enterotoxine**.

Transmis par **l'ingestion d'eau et d'aliment contaminés** et survient dans les situation d'hygiène précaire et des milieux très défavorisés.

Le vibrio peut survivre longtemps dans un **milieu hydrique et salé**.

Tableau clinique très variable: du **simple portage asymptomatique** à un état gravissime de déshydratation.

Fièvre modérée. Vomissements initiaux suivis par une diarrhée liquide rapidement importante.

La déshydratation peut entraîner en quelques heures un état de choc hypovolémique avec insuffisance rénale. L'**absence de compensation des pertes** conduit au décès



3. Diarrhée hémorragique et très fébrile, due à des germes invasifs:

Les germes invasifs sont responsables d'entérocolites, entraînant une diarrhée avec sang et glaire, très fébrile (60% des cas).

Dans 40% des cas la diarrhée est hydrique, banale mais l'importance de la fièvre et des douleurs abdominales attire l'attention.



a. Salmonella non typhi

cause la plus fréquente des TIA, prédominance estivale.

Forme collective.

Les volailles sont des réservoirs naturelles. Autres aliments: pâtisserie à crème, laitage, pâté, viande, coquillage.

Incubation : 8h

Diarrhée liquide, fétide, vomissement, douleurs abdominales, fièvre.

Principales souche: *S. enteritidis* et *S. typhimurium*

hémoculture positive dans 5 à 10 % des cas. Métastase septique: endocardite, méningite...

La fièvre disparait en 2 jours et la diarrhée en 1 semaine.



b. Salmonella typhi et paratyphi

Responsables de la **fièvre typhoïde**

Transmission exclusivement **inter-humains** à partir d'un porteur sain

Voie de contamination: l'eau ou un aliment contaminé

La fièvre typhoïde ne représente à présent que 8% de toute les infections à Salmonelle

Incubation : 1 à 2 semaines

Fièvre élevée, douleurs abdominales, diarrhée inconstante, liquide et fétide

Complication graves: perforation, hémorragie digestive, myocardite...



c.3. *Campylobacter*

La fréquence des diarrhée à *C. jejuni* est importante.
Transmission essentiellement alimentaire (**volaille, produit laitier non pasteurisé, eau non chloré**).
Atteint surtout les **enfants de moins de 10 ans**. Cas **sporadique** le plus souvent

Incubation: 2 à 3 jours parfois 10 jours

Tableau clinique variable: diarrhée liquide peu marqué toujours avec fièvre et douleur abdominale dans 40 à 70 % des cas

Signes généraux très fréquents: céphalée, myalgie, anorexie, amaigrissement.

Evolution en général favorable en 1 semaine.



c.1. *Shigella*

Entérobactérie très virulente.

Shigellose endémique dans les zones tropicales ou subtropicales, maladie transmise de personne à personne le plus souvent ou par l'intermédiaire de l'eau et d'aliment contaminés.

Incubation : 1 à 3 jours

Au début diarrhée hydrique, fébrile qui soit guérit spontanément ou se poursuit par un syndrome dysentérique fébrile, avec de nombreuse émission rectale glairo-sanglante ou même purulente

Les formes les plus graves sont dues à *S dysenteriae*.



c.2. *E.coli* enteroinvasif (EIEC)

Un sérogroupe d'*E.coli* ressemblant à *Shigella*, concerne les enfants de moins de 10 ans des pays en voie de développement.

Syndrome dysentérique fébrile ressemblant à celui de *Shigella* mais moins marqué.



c.4. *Yersinia enterocolitica*

Seuls les **sérotypes O3 et O9** sont pathogènes.

Plus fréquente en Europe du nord

Aliments : viande de porc, charcuterie, volaille, lait et dérivés.

Transmission possible par **voie orale**

Incubation: 3 à 7 jours

Tableau clinique variable: selles molles ou entérocolite grave avec nombreuse émission de selles sanguinolentes, douleur abdominale fréquente, fièvre inconstante.



4. Tableau clinique associé extra digestif:

Aux manifestations digestives peuvent se surajouter d'autres symptômes qui dans certains cas dominent le tableau clinique



a. *E.coli entérohémorragique* (EHEC)
O157: H7

Décrit dans les colites hémorragique épidémique aux USA et au Canada.

Aliments: viande de berger, lait non pasteurisé, volaille insuffisamment cuite, eau non chloré.

Fièvre inhabituelle et modérée, les émission sanglantes durent moins d'une semaine et sont parfois précédés par une diarrhée hydrique.

La maladie peut se compliquer en un syndrome hémolytique urémique caractérisé par une anémie hémolytique, une thrombopénie, une insuffisance rénale.



b. *Clostridium botulinum*

Secrète une exotoxine très virulente qui est préformé dans l'aliment.

Les spores thermorésistantes peuvent contaminer les aliments, elles peuvent donner des formes végétatives qui produisent l'exotoxine thermolabile.

Le tableau clinique est essentiellement neurologique et grave: après quelques heures à quelques jours douleurs abdominales, vomissement et diarrhée puis rapidement troubles neurologiques (fatigue, étourdissement, troubles oculaires, sécheresse de la bouche, gêne à la déglutition, dans certains cas extrême insuffisance respiratoire), pas de fièvre

Diagnostique biologique: recherche de la toxine dans le sérum du malade.



PRÉVENTION

- Respecter les conditions de conservation des aliments
- Contrôler la date limite de la consommation des aliments emballés
- Nettoyer le réfrigérateur régulièrement
- Se laver les mains
- Laver les produits frais (légumes, fruits...)

