



Recherche pour la référence

Vers une norme européenne de surveillance et de dépistage de *Clostridium botulinum* s'appuyant sur des outils moléculaires élaborés dans le cadre des projets de recherche européens Biotracer et AniBioThreat et des programmes NRBC

P. Fach [Patrick.Fach@anses.fr] (1), C. Woudstra (1), R. Knutsson (2)

(1) Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

(2) SVA (National Veterinary Institute), Department of Bacteriology, Uppsala, Suède

C. Woudstra, R. Knutsson, P. Fach (2012). Vers une norme européenne de surveillance et de dépistage de *Clostridium botulinum* s'appuyant sur des outils moléculaires élaborés dans le cadre des projets de recherche européens Biotracer et AniBioThreat et des programmes NRBC, EuroReference, No. 7, ER07-12RE01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero7/PN5001.htm>

Une gamme d'outils de détection intégrant des techniques de dépistage des agents du botulisme et des incidents associés est nécessaire pour améliorer le dépistage et la surveillance des contaminations accidentelles et/ou volontaires de la chaîne alimentaire par des *Clostridium* producteurs de neurotoxines botuliques. La complexité de cette menace nécessite la mise au point de techniques de détection ciblant des marqueurs génétiques hautement spécifiques ainsi que leur évaluation, dans le cadre d'essais inter-laboratoires à l'échelle européenne, pour l'harmonisation d'un solide système de dépistage et de surveillance. Lors de différents projets de recherche européens, des tests de détection spécifiques par PCR en temps réel ont été élaborés pour la détection des types A, B, E et F de *C. botulinum* responsables du botulisme humain, ainsi que des types C, D de *C. botulinum* et des types mosaïques C/D et D/C associés dans le botulisme animal. Ces tests ont été intégrés dans un système prêt à l'emploi et simple d'utilisation, sous format GeneDisc® (Pall-GeneDisc® Technologies), qui a été évalué lors d'essais inter-laboratoires menés à l'échelle européenne. Les résultats obtenus se sont révélés spécifiques et fiables; cette méthode a ainsi été proposée au Comité européen de normalisation (CEN/TC 275/WG 6/TAG 3) comme technique internationale de référence pour le dépistage et la surveillance des types A, B, E et F de *C. botulinum* dans la chaîne alimentaire.

Introduction

Clostridium botulinum est responsable de la paralysie flasque aiguë botulique chez l'Homme, principalement par botulisme alimentaire (Rebagliati, Philippi *et al.* 2009), botulisme infantile (King, Popoff *et al.* 2010), botulisme d'inoculation et botulisme infectieux chez l'adulte (Schroeter, Alpers *et al.* 2009). Le botulisme alimentaire est lié à une intoxication alimentaire provoquée par l'ingestion de neurotoxine botulique préformée (BoNT) (Rebagliati, Philippi *et al.* 2009). Les bactéries Gram-positives anaérobies *C. botulinum* produisent sept neurotoxines botuliques différentes (A à G) en fonction de leurs propriétés antigéniques (Gimenez 1976). Les toxines de type A, B, E et F sont essentiellement responsables du botulisme humain, tandis que les toxines de type C et D sont davantage impliquées dans le botulisme animal (Popoff 1995). *C. botulinum* forme quatre groupes génotypiquement et phénotypiquement distincts, désignés par les chiffres I à IV (Smith 1988). Les bactéries du groupe I (*C. botulinum* protéolytique) et celles du groupe II (*C. botulinum* non protéolytique) provoquent principalement le botulisme humain. Celles du groupe III (types C et D) sont responsables du botulisme animal et celles du groupe IV, également connues sous le nom de *C. argentinensis*, ne sont habituellement associées à aucune maladie (Hatheway 1995). Deux autres espèces de *Clostridium*, *C. baratii* (type F) et *C. butyricum* (type E) peuvent également produire des neurotoxines botuliques (McCroskey, Hatheway *et al.* 1986; McCroskey, Hatheway *et al.* 1991). Tous les sous-types de BoNT agissent au niveau de la jonction neuromusculaire, bloquant la libération d'acétylcholine en perturbant le mécanisme d'exocytose et provoquant une paralysie flasque (Poulain, Lonchamp *et al.* 2009). Le botulisme étant une maladie mortelle, un diagnostic

rapide est la clé de la réussite du traitement. La détection de la toxine dans le sérum et/ou les selles du patient par le test de létalité sur souris demeure la technique de référence (Kautter and Solomon 1977). Le test biologique de létalité sur souris est suivi d'une séroneutralisation qui permet d'identifier le type de toxine avec une grande précision, parmi les 7 types de toxine existants. Le test biologique sur souris présente toutefois plusieurs inconvénients : il est chronophage, coûteux et soulève des questions éthiques en lien avec l'utilisation d'animaux. Quant à la séroneutralisation, des antisérums équins sont commercialisés par le NIBSC (division de l'Agence britannique de protection de la santé), mais seule une poignée de laboratoires est équipée pour réaliser des tests biologiques sur souris dans le cadre d'analyses de routine. Le test de séroneutralisation permet de révéler la présence de BoNT dans des échantillons cliniques et alimentaires et d'identifier le type de toxine; un résultat négatif n'exclut cependant pas la possibilité d'un botulisme, la toxine pouvant être dégradée rapidement. De plus, pour des raisons d'éthique, l'utilisation du plus petit nombre possible de tests sur souris constitue également une demande de la part des laboratoires qui interviennent dans la détection des *Clostridium* producteurs de BoNT. Les recherches se sont ainsi portées sur la mise au point de techniques biologiques alternatives rapides, spécifiques et fiables permettant d'identifier les *Clostridium* producteurs de BoNT. La toxine botulique peut être détectée au moyen de diverses techniques, y compris le dosage par immunosorbant lié à une enzyme (ELISA) (Abbasova, Ruddenko *et al.* 2011) ou le dosage par fixation à des récepteurs à activité endopeptidase (EARB) (Evans, Skipper *et al.* 2009). Un autre nouveau concept exploite le clivage de peptides de synthèse par les BoNT,



Recherche pour la référence

suivi de la détection des peptides résultants par désorption/ionisation de matrice par laser (MALDI) et/ou spectrométrie de masse (MS) avec ionisation par électrobulbion (ESI) (Boyer, Moura *et al.* 2005). Cette technique, dénommée Endopep-MS, a été utilisée avec succès pour la détection des sept sérotypes de BoNT dans une solution tampon et les limites de détection des BoNT/A, /B, /E et /F se sont révélées inférieures à celles obtenues avec le test biologique sur souris. Une évolution de la technique Endopep-MS, incluant une étape de purification par immunoaffinité, a été utilisée pour détecter les BoNT/A, /B, /E et /F dans des échantillons de sérum et de selles humains (Kalb, Moura *et al.* 2006). Les techniques de détection moléculaire reposant sur l'ADN sont également reconnues comme des tests diagnostiques avantageux. Bien qu'ils ne pallient pas l'inconvénient de la détection des bactéries et non des toxines, les tests à ADN présentent l'avantage d'être rapides, simples et hautement spécifiques. Les tests reposant sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) offrent une alternative fiable pour le dépistage des gènes codant les neurotoxines, révélant ainsi la présence de *C. botulinum* et d'autres *Clostridium* producteurs de BoNT dans les colonies bactériennes, les cultures pures en milieu liquide et les enrichissements d'échantillon, sans recourir à des animaux de laboratoire (Fach, Gibert *et al.* 1995; Fach, Fenicia *et al.* 2011).

Le botulisme constitue une menace pour les producteurs et les consommateurs de denrées alimentaires, mais la dispersion volontaire de neurotoxines botuliques sous forme d'aérosols ou la contamination de la chaîne alimentaire par ces bactéries à des fins de bioterrorisme est une source d'inquiétude (Arnon, Schechter *et al.* 2001; Wein and Liu 2005). *C. botulinum* a été classé par le CDC (Centre américain pour le contrôle et la prévention des maladies) comme agent de catégorie A et a été intégré à la liste des agents biologiques du Groupe australien (AG). Cette espèce, de même que d'autres *Clostridium* producteurs de BoNT, s'est révélée susciter de profondes inquiétudes au niveau mondial, malgré une importante sous-déclaration due au fait que de nombreux laboratoires sont incapables d'isoler, d'identifier et de caractériser ces espèces. La mise à disposition de techniques rapides et spécifiques permettant de tester les *Clostridium* producteurs de BoNT constitue un préalable à l'établissement de programmes de surveillance destinés à dépister les contaminations par *C. botulinum* chez l'animal et dans l'alimentation. La conception récente de tests diagnostiques reposant sur l'amplification multiplex d'acides nucléiques et sur la détection par microfluidique sur des plates-formes normalisées utilisables dans les services hospitaliers ou les laboratoires de santé publique apporte de nouveaux outils pour l'évaluation des risques de santé publique associés aux souches de *Clostridium* productrices de BoNT.

Pour améliorer la surveillance ainsi que l'évaluation des menaces par leur reconnaissance, différents projets de recherche se sont organisés en Europe, tels les projets européens BIOTRACER (www.biotracer.org) et AniBioThreat (www.anibiothreat.com) ou les programmes CBRN (chimique, biologique, radiologique et nucléaire). BIOTRACER a été conçu sous la forme d'un projet intégré, dans le cadre du sixième programme-cadre de l'Union européenne, dans l'aire de recherche intitulée Qualité et sécurité des aliments (FP6-2006-Food-036272). Intitulé « *Improved bio-traceability of unintended micro-organisms and their substances in food and feed chains* » (Amélioration de la traçabilité des micro-organismes indésirables et de leurs substances dans les chaînes alimentaires humaine et animale),

ce projet a pour objectif de créer des outils et des modèles en vue de l'amélioration de la surveillance des contaminations microbiennes accidentelles et volontaires dans l'alimentation animale et humaine, y compris l'eau en bouteille. AniBioThreat est un autre projet européen qui a été financé en 2010, pour trois ans, par la Commission européenne (DG Justice, liberté et sécurité). Intitulé « *Bio-preparedness measures concerning prevention, detection and response to animal bio-terrorism threats* » (Mesures de préparation biologique pour la prévention, la détection et la réponse aux menaces de bioterrorisme animal), ce projet s'intéresse plus précisément aux menaces de bioterrorisme animal. L'objectif du projet AniBioThreat est d'améliorer la capacité de l'UE à contrer les menaces de bioterrorisme animal en matière de sensibilisation, de prévention et d'éventualités. Il se concentre plus particulièrement sur les menaces faites aux animaux vivants, à l'alimentation animale et aux aliments d'origine animale. Quant aux programmes CBRN, la Direction des sciences du vivant du CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) est engagée dans un effort national afin de répondre à un besoin urgent de sécurité face aux menaces biologiques et de disposer des techniques et des ressources biologiques permettant de diagnostiquer et/ou de détecter des agents de bioterrorisme tels que *C. botulinum*. Dans le cadre des projets de recherche européens BIOTRACER et AniBioThreat et du programme interministériel NRBC, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été sollicitée pour prendre part à la lutte contre le bioterrorisme en améliorant le dépistage et la surveillance des contaminations accidentelles et volontaires par *C. botulinum* dans la chaîne alimentaire. C'est dans ce but qu'elle a mis au point de nouvelles techniques rapides de détection des acides nucléiques reposant sur des tests par PCR en temps réel. L'accent a notamment été mis sur la simplicité d'utilisation de ces techniques. Les techniques élaborées dans le cadre de ces projets doivent permettre de détecter et de répondre à des épidémies liées à des contaminations accidentelles et volontaires de l'alimentation animale et humaine par des *Clostridium* producteurs de BoNT.

Résultats

Programmes de recherche BIOTRACER et CBRN

Une première étape dans la mise au point d'une technique moléculaire de référence pour le dépistage de *C. botulinum* a consisté à élaborer une série de tests de PCR en temps réel afin de dépister et de surveiller les *Clostridium* responsables du botulisme humain (Fach, Mischeu *et al.* 2009). Des tests de PCR en temps réel reposant sur la détection des gènes codant les protéines non toxiques et non hémagglutinantes (NTNH) ou les régions les plus homologues des gènes des neurotoxines botuliques (bont) ont été élaborés, de même que quatre tests par PCR en temps réel dont chacun est spécifique des gènes bont/A, bont/B, bont/E, bont/F et permet une identification spécifique du type de toxine. La spécificité de ces tests de PCR a été démontrée au moyen d'un panel de *Clostridium* producteurs de toxines botuliques (29 souches), de *Clostridium* non producteurs de toxines botuliques (21 souches) et de diverses autres souches bactériennes. Les tests spécifiques du type toxinique ont présenté une sensibilité de 100 fg à 1 000 fg d'ADN total dans le tube de PCR (25 à 250 équivalents-génome). Ces dosages par PCR se sont révélés spécifiques et fiables pour la détection des *Clostridium* producteurs de BoNT



Recherche pour la référence

hétérogènes, responsables du botulisme humain. L'applicabilité de ces dosages pour l'analyse d'échantillons alimentaires a été évaluée sur un échantillon de foie gras recueilli lors d'une épidémie d'origine alimentaire associée au type A de *C. botulinum*, qui a eu lieu en France en décembre 2007 (Fach *et al.* 2009). Après enrichissement en conditions anaérobies et extraction de l'ADN, cet échantillon s'est révélé positif lors d'un test par PCR ciblant les séquences géniques bont/A et NTNH. Le test classique de létalité sur souris a corroboré les résultats obtenus par PCR. L'adoption de ces dosages par PCR dans l'analyse d'un cas d'épidémie par *C. botulinum* a représenté un net progrès pour une détection rapide et fiable de ces *Clostridium* dans les échantillons alimentaires.

Suite à ces résultats, les tests ainsi élaborés ont été intégrés à un système de détection prêt à l'emploi, innovant et simple d'utilisation reposant sur le cycleur GeneDisc® (Pall-GeneDisc® Technologies). Ce système a été conçu pour tester simultanément les gènes bont/A, bont/B, bont/E et bont/F codant les neurotoxines botuliques de types A, B, E et F. Cette méthode a été testée sur des *Clostridium* producteurs de BoNT (n = 102) ainsi que sur des bactéries non productrices de BoNT (n = 52), isolés à partir d'échantillons cliniques, alimentaires et environnementaux, et a été comparée avec succès au test classique de létalité sur souris (Fach, Fenicia *et al.* 2011). Un « essai inter-laboratoire » en aveugle du test GeneDisc®, mené dans quatre laboratoires européens avec 77 *Clostridium* producteurs de BoNT et 10 échantillons alimentaires et cliniques, a démontré que le test ainsi élaboré était spécifique et fiable pour l'identification des souches de *Clostridium* productrices de BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E et BoNT/F (figure 1) ainsi que pour le dépistage d'échantillons d'aliments et de selles naturellement contaminés, issus d'épisodes de botulisme.

Les résultats de PCR ont pu être obtenus sans qu'il soit nécessaire de disposer de personnel formé à cet effet et le test a été réalisé en un temps très court, les données étant disponibles au bout de 2 jours seulement après réception de l'échantillon. La durée totale du test prend en compte l'étape d'enrichissement (48 heures), l'extraction de l'ADN (30 minutes) et la détection par PCR (< 1 heure). Plus rapide que le test biologique classique sur souris, qui nécessite 2 à 5 jours, cette technique peut permettre de réduire le nombre de tests sur animaux, de raccourcir le délai d'obtention des résultats et de diminuer le coût d'analyse. En outre, toutes les étapes de préamplification liées à la préparation des échantillons peuvent être automatisées au moyen de protocoles de purification d'ADN robotisés classiques. Il n'y a aucune exigence spécifique quant à la préparation des échantillons, en dehors de l'étape d'incubation en anaérobiose nécessaire à la multiplication des *Clostridium*.

Au vu des résultats obtenus avec le test GeneDisc®, un essai inter-laboratoire a été mené à l'échelle européenne, dans quatre laboratoires différents situés en Italie, en France, aux Pays-Bas et en Suède, avec 47 souches et 30 échantillons cliniques et alimentaires liés à des cas de botulisme, sur différentes plates-formes ouvertes de PCR en temps réel (Fenicia, Fach *et al.* 2011). Cet essai a été réalisé avec les amorces et les sondes décrites par Fach *et al.* (2009), qui sont également les mêmes que celles utilisées dans le GeneDisc®. Les résultats obtenus ont révélé une concordance de 95,7 % entre les quatre laboratoires. Au vu du haut niveau de concordance obtenu, les tests par PCR en temps réel ainsi élaborés se révèlent être une technique appropriée pour la détection et le typage rapides de *Clostridium* producteurs de BoNT dans des échantillons cliniques, alimentaires et environnementaux, ce qui plaide en

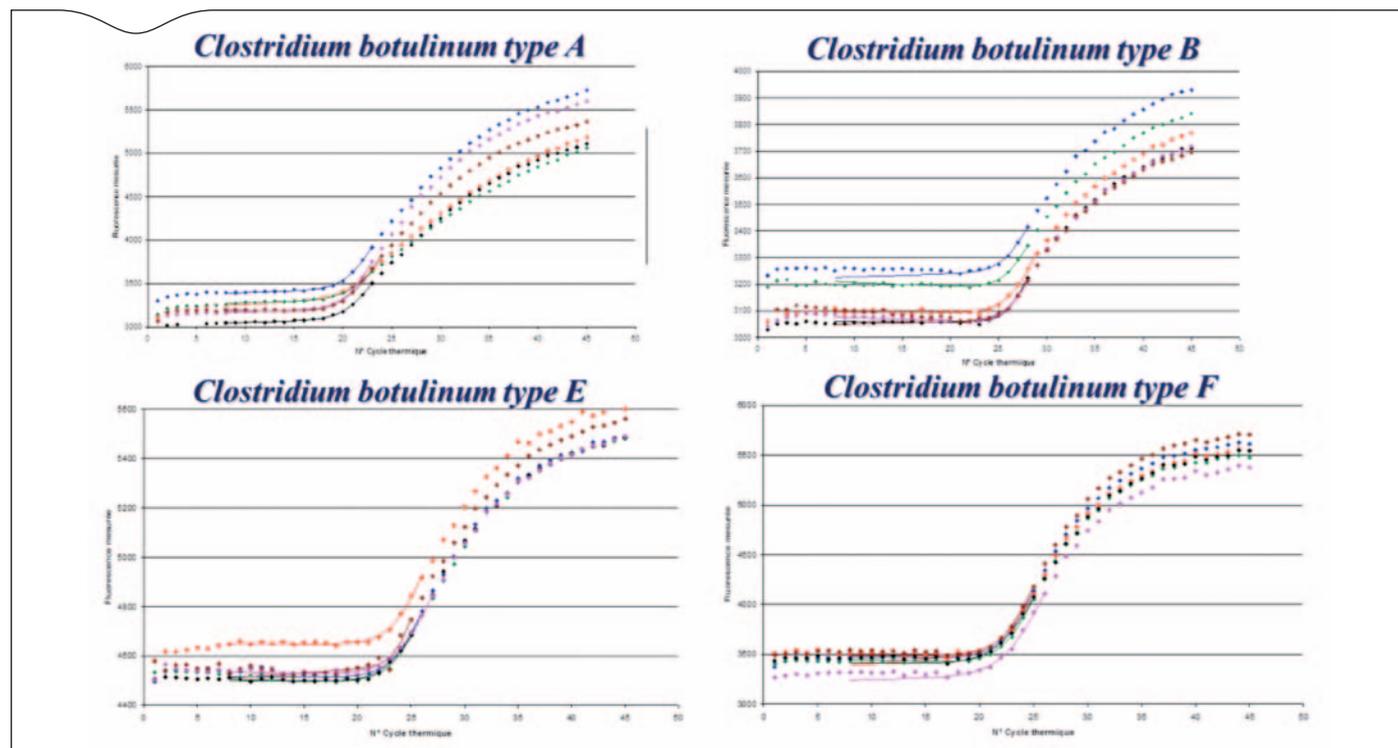


Figure 1. Détection des types A, B, E et F de *C. botulinum* à l'aide du kit GeneDisc.



Recherche pour la référence

faveur de leur utilisation comme technique internationale de référence.

AniBioThreat

Dans le cadre du projet AniBioThreat, des épisodes de botulisme animal survenus dans différentes régions géographiques d'Europe ont été analysés pour permettre de mieux appréhender le profil génique des neurotoxines des *Clostridium* producteurs de neurotoxines, responsables du botulisme animal en Europe. Les données ont ainsi démontré que les types mosaïques D/C sont fortement représentés dans les isolats bovins, tandis que les types mosaïques C/D sont hautement représentés dans les isolats issus de différentes espèces aviaires. Il convient de noter que tous les échantillons positifs ont été répertoriés comme étant de type mosaïque C/D ou D/C, indépendamment de la nature des échantillons et des régions où ils ont été recueillis (Woudstra *et al.* 2012). Des recherches plus approfondies doivent être menées dans d'autres régions d'Europe afin de poursuivre l'étude de la prévalence des types mosaïques C/D et D/C et de confirmer que les types mosaïques dominent en Europe. On peut supposer que l'acquisition de types mosaïques aide à survivre ou à s'adapter à une niche écologique donnée. En conséquence, les types mosaïques seraient plus fréquents que l'on ne pourrait s'y attendre. Malgré les nombreux efforts mis en œuvre pour isoler les souches des échantillons positifs, aucune souche n'a pu être isolée au cours de cette étude. Il est très difficile d'isoler les types C et D de *C. botulinum* et cela est probablement dû au fait que les gènes des neurotoxines sont véhiculés par des bactériophages et qu'ils se perdent donc facilement lors des étapes d'isolement en laboratoire. En l'absence du séquençage complet des gènes de toxines dans les échantillons analysés lors de cette étude, aucune notion de clonalité ne peut pas être confirmée. Nos données confirment cependant que les types de gène mosaïques sont courants en Europe. Les types mosaïques sont probablement sous-diagnostiqués puisque la plupart des tests par PCR disponibles dans la littérature ne parviennent pas à distinguer les types de gène de neurotoxine mosaïques des types C et D non mosaïques. Ils peuvent également échapper au diagnostic en raison d'un toxinotypage sérologique incomplet au sein des laboratoires de diagnostic. La mise au point d'une alternative rapide, spécifique et fiable sous format GeneDisc® pour identifier les *Clostridium* responsables du botulisme animal en Europe constitue une amélioration significative pour la surveillance des contaminations par *C. botulinum* et la prévention des épizooties.

Conclusion

Les organisations internationales telles que l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) manifestent, depuis quelques années, leur inquiétude qu'une contamination accidentelle ou volontaire de la chaîne alimentaire puisse porter atteinte à la population civile et provoquer des pertes économiques, et unissent leurs efforts pour mieux appréhender ces risques. De plus en plus sensibilisées au fait que la chaîne alimentaire peut être vulnérable aux contaminations volontaires, ces organisations ont émis différentes recommandations quant à la façon de prévenir ces menaces et d'y répondre. Dans son rapport intitulé « Terrorist Threats to Food » (Menaces terroristes dans le domaine alimentaire), l'OMS souligne que la mise en place d'un réseau d'urgence international de sécurité alimentaire fait partie

des mesures de préparation cruciales. Avec le soutien de la FAO et de l'OMS, l'OIE a également engagé des actions contre le bioterrorisme. Dans la lignée de ces institutions et organisations, les gouvernements continuent de se préparer à des incidents de contamination volontaire de la chaîne alimentaire.

Le botulisme est la maladie d'origine alimentaire la plus grave et est à ce titre considéré comme une urgence de santé publique ; l'éventualité d'une contamination volontaire de la chaîne alimentaire par des *Clostridium* producteurs de neurotoxines demeure par ailleurs une inquiétude pour les autorités de sécurité alimentaire en Europe (Knutsson *et al.* 2011). L'objectif principal est de développer une technique appropriée normalisée, rapide et spécifique permettant de détecter et de typer les *Clostridium* producteurs de BoNT, pour une identification rapide de la source de risque possible et la prise en charge clinique des patients. Étant donné que différentes espèces de *Clostridium* producteurs de BoNT ont été associées à des cas de botulisme, une technique par PCR en temps réel permettant de détecter les gènes codant les BoNT demeure l'outil le plus utile pour leur détection. Dans le cadre de programmes NRBC et de différents projets de recherche européens tels que BIOTRACER ou AniBioThreat, nous sommes parvenus à élaborer des tests de PCR en temps réel permettant de répondre à des épidémies associées à des contaminations botuliques accidentelles et volontaires en analysant des échantillons de nourriture animale, de nourriture humaine et de selles (Fach, Mischeau *et al.* 2009). Les dosages par PCR élaborés dans le cadre de ces projets ont permis de détecter des souches de type bivalent et/ou mosaïque, parfois difficiles à identifier par les dosages biologiques classiques sur souris. Ces dosages ont par ailleurs été adaptés sur la plate-forme GeneDisc® et évalués pour une détection multiplex des types A, B, E et F de *C. botulinum* (Fach, Fenicia *et al.* 2011). En outre, une évaluation a été menée dans quatre laboratoires européens différents afin d'évaluer ce test PCR pour la détection des types A, B, E et F de *C. botulinum* dans des échantillons alimentaires et cliniques ((Fenicia, Fach *et al.* 2011). Cette technique ne remplace pas le dosage biologique classique sur souris, mais peut être utilisée pour réduire le nombre de tests sur animaux, raccourcir le délai d'obtention du diagnostic et diminuer le coût d'analyse. Les données obtenues ont été présentées au CEN/TC275/WG6 afin de proposer cette méthode comme technique de référence.

Remerciements

Cette étude a reçu le soutien du projet européen BIOTRACER (contrat n° 06272), dans le cadre de la 5^e priorité du sixième programme-cadre intitulée Qualité et sécurité des aliments, et a été subventionnée dans le cadre du projet européen AniBioThreat (convention de subvention: Home/2009/ISEC/AG/191), avec le soutien financier du Programme de prévention et de lutte contre le crime de l'Union européenne, Commission européenne – Direction générale Affaires intérieures. Cette publication reflète l'opinion de ses seuls auteurs ; la Commission européenne ne peut être tenue responsable de l'utilisation, quelle qu'elle soit, qui pourrait être faite des données qu'elle contient.



Recherche pour la référence

Références bibliographiques

Abbasova, S. G., Ruddenko, N. V., *et al.* (2011). « [Monoclonal antibodies to type A, B, E and F *botulinum* neurotoxins] ». *Bioorg Khim* 37(3): 344-353.

Arnon, S. S., Schechter, R., *et al.* (2001). « Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management ». *JAMA* 285(8): 1059-1070.

Boyer, A. E., Moura, H., *et al.* (2005). « From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoproteinase activities of *botulinum* neurotoxins A-G by mass spectrometry ». *Anal Chem* 77(13): 3916-3924.

Evans, E. R., Skipper, P. J., *et al.* (2009). « An assay for botulinum toxin types A, B and F that requires both functional binding and catalytic activities within the neurotoxin ». *J Appl Microbiol* 107(4): 1384-1391.

Fach, P., Fencica, L., *et al.* (2011). « An innovative molecular detection tool for tracking and tracing *Clostridium botulinum* types A, B, E, F and other *botulinum* neurotoxin producing *Clostridia* based on the GeneDisc cycliser ». *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1: S145-151.

Fach, P., Gibert, M., *et al.* (1995). « PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A, B, E, F, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples ». *Appl Environ Microbiol* 61(1): 389-392.

Fach, P., Micheau, P., *et al.* (2009). « Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* ». *J Appl Microbiol* 107(2): 465-473.

Fencica, L., Fach, P., *et al.* (2011). « Towards an international standard for detection and typing botulinum neurotoxin-producing *Clostridia* types A, B, E and F in food, feed and environmental samples: a European ring trial study to evaluate a real-time PCR assay ». *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1: S152-157.

Gimenez, D. F. (1976). « Serological classification and typing of *Clostridium botulinum* ». *Dev Biol Stand* 32: 175-183.

Hatheway, C. L. (1995). « Botulism: the present status of the disease ». *Curr Top Microbiol Immunol* 195: 55-75.

Kalb, S. R., Moura, H., *et al.* (2006). « The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples ». *Anal Biochem* 351(1): 84-92.

Kautter, D. A. et Solomon, H. M. (1977). « Collaborative study of a method for the detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods ». *J Assoc Off Anal Chem* 60(3): 541-545.

King, L. A., Popoff, M. R., *et al.* (2010). « [Infant botulism in France, 1991-2009] ». *Arch Pediatr* 17(9): 1288-1292.

Knutsson, R., van Rotterdam, B., *et al.* (2011). « Accidental and deliberate microbiological contamination in the feed and food chains – How biotraceability may improve the response to bioterrorism ». *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1: S123-S128.

McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., *et al.* (1986). « Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism ». *J Clin Microbiol* 23(1): 201-202.

McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., *et al.* (1991). « Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult ». *J Clin Microbiol* 29(11): 2618-2620.

Popoff, M. R. (1995). « Ecology of neurotoxicogenic strains of *Clostridia* ». *Curr Top Microbiol Immunol* 195: 1-29.

Poulain, B., Lonchamp, E., *et al.* (2009). « [Mechanisms of action of botulinum toxins and neurotoxins] ». *Ann Dermatol Venereol* 136 Suppl 4: S73-76.

Rebagliati, V., Philippi, R., *et al.* (2009). « Food-borne botulism in Argentina ». *J Infect Dev Ctries* 3(4): 250-254.

Schroeter, M., Alpers, K., *et al.* (2009). « Outbreak of wound botulism in injecting drug users ». *Epidemiol Infect* 137(11): 1602-1608.

Smith, L. D. S. et Sugiyama, H. (1988). « Botulism. The organism, its toxins, the disease ». Charles C. Thomas, Springfield, Ill.

Wein, L. M. et Liu, Y. (2005). « Analyzing a bioterror attack on the food supply: the case of botulinum toxin in milk ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(28): 9984-9989.

Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fencica, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bâyon-Auboyer, M. H., Buffereau, J. P., De Medici, D., Fach, P. « Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D gathered from different countries within Europe ». *Appl Environ Microbiol*. 2012 (sous presse).