

**PREVALENCE ET CARACTERISATION
DE SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* O157 PRODUCTRICES DE SHIGATOXINES
ISOLEES DE DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE
EN BELGIQUE ET EN ALGERIE.**

**PREVALENCE AND CHARACTERIZATION
OF O157 SHIGATOXIN PRODUCING *ESCHERICHIA COLI*
ISOLATED FROM FOODSTUFFS FROM ANIMAL ORIGIN
IN BELGIUM AND ALGERIA**

THESE PRESENTEE PAR
AMINA CHAHED
EN VUE DE L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ORIENTATION MEDECINE VETERINAIRE

ANNEE ACADEMIQUE ; 2006-2007

II: EN ALGERIE

ETUDE IV : Evaluation du taux de contamination des carcasses bovines par les *Escherichia coli* entérohémorragiques du sérotype O157 et d'autres *Escherichia coli* attachantes et effaçantes

Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria.

A. CHAHED, B. CHINA, J. MAINIL and G. DAUBE

Journal of Applied Microbiology, 2006, 101, 361-368.

I. Justifications de la recherche

Les STEC O157 ont été détectés dans tous les pays où ils ont été recherchés, néanmoins des différences au niveau des prévalences enregistrées sont constatées au niveau des différentes régions du globe. Il existe très peu de données à ce sujet en Afrique du Nord et particulièrement en Algérie. De ce fait, les premières recherches des STEC O157 ont été mises en place au niveau de l’Institut Pasteur d’Alger avec l’étroite collaboration du laboratoire national de référence en microbiologie des aliments de l’Université de Liège.

L’objectif était d’établir l’existence de ces pathogènes au niveau de l’abattoir principal produisant des carcasses de bœuf destinées à la consommation humaine pour la population d’Alger et de ses environs.

II. Matériel

1. Lieu des prélèvements

L’étude a été réalisée dans un des plus importants abattoirs d’animaux de boucherie algérien dont la production de viande bovine est destinée à une grande partie de la population de la ville d’Alger et ses environs. Les prélèvements ont été effectués sur une période de neuf mois (en 2001) à raison de 5 à 10 carcasses de bœuf par semaine à différents jours de la semaine pour avoir une meilleure représentativité de la production.

2. Matrices analysées et méthodes de prélèvements :

Deux cent trente carcasses de bovins ont été écouvillonnées à la fin des opérations d’abattage. La méthode utilisée est celle du double écouvillonnage conformément au schéma de contrôle adapté de l’USDA et à la directive européenne 2001/471/CE (CE, 2001). Elle consiste en un premier passage sur les zones à écouvillonner (quatre zones de 400 cm^2) avec un coton imbibé d’une solution stérile de tryptone sel et un second passage sur les mêmes zones avec un coton sec. Les zones écouvillonnées (1600 cm^2) sont situées au niveau de la zone postéro-externe de la cuisse, du flanc, du thorax et de la face postérieure du membre antérieur (figure III.2).

Les prélèvements ont été effectués par les mêmes opérateurs formés à la technique pendant toute la durée de l’étude. Les échantillons ont été acheminés au laboratoire dans une glacière et stockés à $+4^\circ\text{C}$ pour analyse 24 heures après réception.

III. Méthodes analytiques

1. Méthodes de recherche des STEC O157

Les écouvillons composant un échantillon ont été soumis successivement à une étape de pré-enrichissement dans 100 ml de bouillon mTSB + novobiocine (Oxoid) pendant 6h à 42°C et un enrichissement dans du bouillon de Mac Conkey (Oxoid) + cefixime ($0,050 \text{ mg}^{-1}$) + tellurite de potassium ($2-5 \text{ mg}^{-1}$) incubé à 37°C pendant 18 h. Un millilitre du bouillon d'enrichissement est soumis à une étape d'immuno-concentration magnétique (Dynabeads O157, Invitrogen). Cent microlitres du concentrat billes magnétiques et bactéries ont été ensemencés sur la gélose Mac Conkey au sorbitol supplémentée de cefixime + tellurite (CT-SMAC, Oxoid) et incubée à 42°C pendant 18 heures. Cinq colonies sorbitol négatives et une colonie sorbitol positive sont agglutinées au latex anti-O157 (Dry-Spot *E. coli* O157, Oxoid). La caractérisation biochimique des *E. coli* O157 a été réalisée sur galerie API 20E (Bio Mérieux) et sur gélose rapid *E.coli*, (Bio Rad) pour la recherche de l'activité β -glucuronidase. Une agglutination au latex anti-H7 pour la détection de l'antigène H7 des souches isolées a été effectuée.

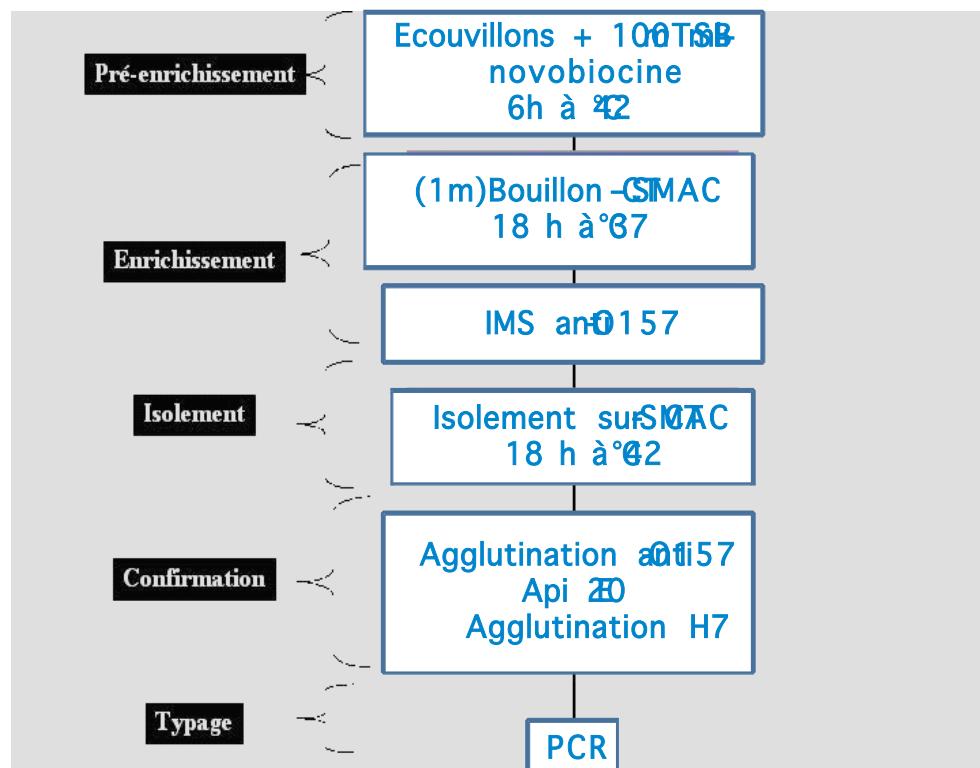


Figure IV.1. Isolement des STEC O157

2. Caractérisation des gènes de virulence par PCR classique et PCR en temps réel

Les gènes de virulence des souches *d'E. coli* O157 isolées ont été mis en évidence par amplification génique. Les amores utilisées dans ce test sont résumées au tableau IV.1.

Une PCR multiplex classique pour les gènes *stx₁*, *stx₂* et *eae* (China et al., 1996) auxquels l'amplification du gène de l'enterohémolysine *ehxA* (amores HlyA460 et HlyA676) a été ajoutée (Chahed et al., 2006), a été réalisée. Le protocole de PCR précédemment décrit (China et al, 1996) a été appliqué.

Gene	Primer name and sequence	Size (bp)	OAT* (°C)	Tm† (°C)	Reference
<i>Eae</i>	B52: aggcttcgtcacagttg	570, ‡	51.9	85.0	China et al., 1996
	B53: ccatcgtaaccaggagga				
<i>Eae</i>	Eae30: ccggcacaataatgc	126, §	50.4	77.5	This study
	Eae135: tttaatccgaacycaattta				
<i>Stx₁</i>	B54: agagcgatgttacggtttg	388, ‡, §	55.5	85.6	China et al., 1996
	B55: ttccccccagagtggatg				
<i>Stx₂</i>	B56: tgggttttcttcggtatac	807, ‡, §	53.4	87.8	China et al., 1996
	B57: gacattctggttgactcttt				
<i>EhxA</i>	HlyA460: aaacaacggaaaggagag	233, ‡	53.3	83.3	This study
	HlyA676: acaacatccagccca				
<i>EhxA</i>	HlyA1814: acgatgtggttattct	167, §	52.2	82.6	This study
	HlyA1961: ctccacgtcaccatacatat				

*: OAT: optimal annealing temperature as calculated by OLIGO6® software

†: melting temperature of the amplicon as calculated by OLIGO6® software

‡: primers used in classical multiplex PCR

§: primers used in real time PCR

Tableau IV.1. Amores utilisées

Une PCR en temps réel en Sybrgreen® pour les gènes *eae*, *stx₁*, *stx₂* et *ehxA* basée sur la différence de température de fusion des amplicons a été développée (Chahed et al., 2006). Le mélange réactionnel était constitué de: 12,5 ul de iTaq sybergreen 2x (Bio Rad), 0,25 ul des amores à 40 uM et de l'eau ultrapure stérile pour atteindre 20 ul. Cinq microlitres d'ADN sont ajoutés à chaque réaction.

Le cycle d'amplification était : 1 fois 50°C pendant 2 min, 1 fois 95°C pendant 3 min, 40 fois (95°C 15 sec, 50°C 30 sec, 72°C 30 sec). Ce cycle était suivi d'un cycle de dissociation en augmentant la température de 60 à 95°C.

3. Recherche des autres sérotypes de STEC par hybridation ADN/ADN sur colonies:

La détection des autres sérotypes d'*E. coli* producteurs de shigatoxines a été réalisée par la méthode d'hybridation ADN/ADN sur colonies (Mainil *et al.*, 1993) décrite au cours de l'étude II. En résumé, L'hybridation ADN-ADN sur colonies a été réalisée après repiquage en double de 10 colonies isolées sur milieu SMAC après 24 h d'incubation à 42°C après l'étape de pré-enrichissement. Les colonies ont été repiquées sur gélose SMAC selon une matrice quadrillée standardisée. Chaque emplacement correspond à une souche différente.

Les colonies ont été transférées sur un filtre en papier, dénaturées, neutralisées et l'ADN est fixé. Après les étapes de préparation des filtres, l'hybridation des colonies a été réalisée à 65°C sous agitation pendant une nuit en présence des trois sondes génétiques marquées, spécifiques des gènes *stx₁*, *stx₂* et *eae* (China *et al.*, 1998). Après hybridation, les filtres sont mis en contact avec un film radiographique dans une plaque à -75°C pendant 24 à 48h. Après développement, un noircissement indique un résultat positif tandis qu'une absence de noircissement indique un résultat négatif.

Les colonies positives pour un des gènes recherchés sont repiquées à partir de la boîte dupliquée et la présence des gènes confirmés par PCR (China *et al.*, 1996).

Le sérotype des souches a été recherché avec des anticorps anti-O26, O91, O103, O111 et O128.

Nom	Type	sérotype	Pathotype	Référence
211	STEC bovine	Rough	<i>stx₂ ehxA</i>	Cette étude
309589	STEC bovine	O20	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>	Cette étude
317589	EHEC bovine	Rough	<i>eae stx₁ ehxA</i>	Cette étude
EH248	EHEC humaine	O103 :H2	<i>eae stx₁ ehxA</i>	Szalo <i>et al.</i> (2002)
EH298	EHEC humaine	O26	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Szalo <i>et al.</i> (2002)
EH291	EHEC humaine	O111	<i>eae stx₁ ehxA</i>	Szalo <i>et al.</i> (2002)
EH296	EHEC humaine	O26:H11	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Szalo <i>et al.</i> (2002)
ATCC43888	EHEC humaine	O157:H7	<i>eae ehxA</i>	Cultures de souches en collection américaine http://www.atcc.org

Tableau IV.2. Caractéristiques des souches de référence utilisées

4. Dénombrement d'*E. coli*

Parallèlement à la recherche des STEC O157 et autres AEEC, le dénombrement des *E.coli totaux* a été réalisé par comptage des colonies obtenues après ensemencement de 1 ml de la suspension-mère et 1 ml de sa dilution au dixième en milieu rapid *E. coli* 2 (Biorad).

Après incubation 24 heures à 44°C, le nombre d'*E. coli* par cm² a été calculé pour chaque carcasse. La distribution en percentiles a été établie.

IV. Résultats et Discussion

1. Analyse de l'hygiène par comptage des *E. coli* totaux

A partir des écouvillons de carcasses, les *E. coli* totaux ont été comptés et le nombre d'ufc par cm² a été calculé et représenté sous forme de percentiles à la figure IV.2.

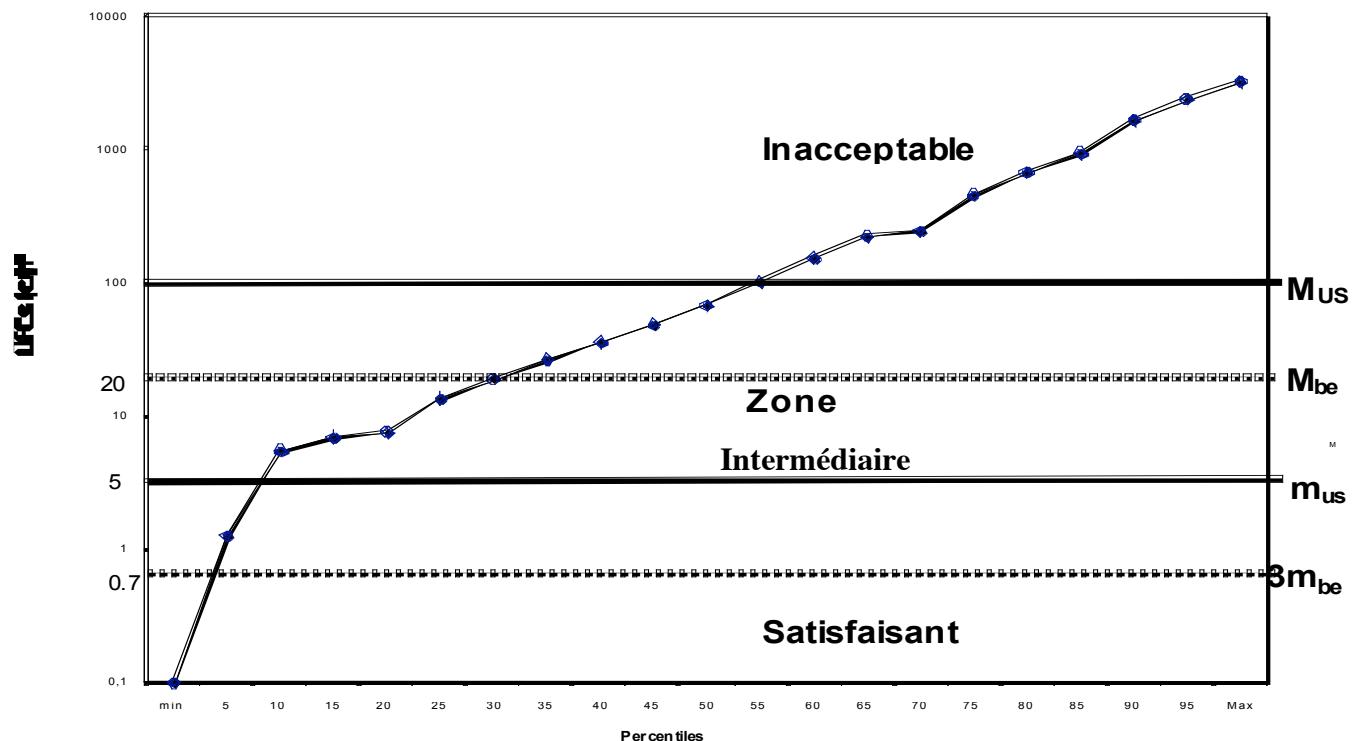
L'indice 3m_{be} est la limite inférieure acceptable (0,7 ufc/cm²) pour le critère belge, M_{be} est la limite supérieure pour le critère belge. m_{us}= limite inférieure pour le critère américain (5 ufc/cm²) et M_{us} : limite supérieure pour le critère américain (100 ufc/cm²). Ces limites permettent de déterminer 3 zones: une zone d'hygiène satisfaisante (en dessous de la limite inférieure), un zone acceptable (entre les deux limites) et une zone inacceptable (au dessus de la limite supérieure). On constate que pour cet abattoir d'Alger, le percentile 75 était de 440 ufc/cm² et le percentile 95 était de 2.300 ufc/cm². Pour mémoire, les limites des critères microbiologiques en Belgique sont de 0,7 ufc/cm² (limite de satisfaction) et 20 ufc/cm² (limite d'acceptabilité).

Les dénombrements des *E. coli*, indicateurs de contamination fécale sur les carcasses produites dans cet abattoir ont montré des valeurs très élevées en nombre d'unités formant colonies par cm² de surface. Les carcasses qui ont été livrées à la consommation étaient fortement contaminées. La limite inférieure de la distribution au percentile 75 est de 440 ufc/cm². De telles valeurs auraient été classées inacceptables si les critères retenus par l'USDA ($m_{(P80)} = 5 \text{ ufc/cm}^2$ et $M_{(P98)} = 100 \text{ ufc/cm}^2$) ou ceux plus stricts pour la Belgique ($m_{p75} = 0,7 \text{ ufc/cm}^2$ et $M_{p95} = 20 \text{ ufc/cm}^2$) avaient été appliqués.

La limite inférieure calculée (440 ufc/cm²) est largement supérieure aux valeurs des limites supérieures retenues par les législations des Etats-Unis et de la Belgique.

La législation belge ne tolère aucun échantillon dans la zone inacceptable et seulement 20% dans la zone acceptable. Cette étude a montré qu'environ 70 % des échantillons algériens sont dans la zone inacceptable et 25 % dans la zone acceptable (> 20%) et seulement 5 % dans la zone satisfaisante. Tandis qu'en appliquant les critères de l'USDA qui sont moins sévères, environ 10 % des résultats sont satisfaisants; 45 % sont dans la zone acceptable et 45 % sont considérés comme inacceptables. Il en résulte que cet abattoir ne répond pas aux principales règles d'hygiène de production des carcasses.

Des recommandations particulières ont été présentées aux services vétérinaires du Ministère de l'Agriculture en Algérie.



Dénombrement des *E. coli* sur les carcasses en UFCs (cm^2) en fonction des percentiles. M_{us} : limite supérieure (100 UFCs (cm^2)) selon l'USDA, m_{us} : limite inférieure (5 UFCs (cm^2)) selon l'USDA. M_{be} : limite supérieure (20 UFCs (cm^2)) selon la loi belge. $3m_{be}$: limite inférieure (0.7 UFCs (cm^2)) selon la loi belge. Trois zones sont définies: la zone supérieure inacceptable, une zone inférieure satisfaisante et une zone intermédiaire acceptable.

Figures IV.2. Dénombrements des *E. coli* répartis en percentiles

2. Prévalence des *Escherichia coli* O157

A partir des mêmes écouvillons de carcasses, la présence d'*E. coli* du sérotype O157 a été recherchée. Dix-huit souches d'EHEC O157 sorbitol et β -glucuronidase négatifs ont été isolées à partir des 230 carcasses de bovins écouvillonnées soit une prévalence égale à 7,8 %.

Deux souches étaient du sérotype O157:H7, les autres étaient du sérotype O157:H-. Dix souches sur dix-huit ont été retrouvées dans des carcasses d'animaux âgés de moins de 1 an (Tableau IV.3)

<i>Carcasses</i> <i>(N°)</i>	<i>Age du bovin</i> <i>(année)</i>	<i>Sérotype</i>	<i>Nombre d'<i>E. coli</i></i> <i>ufc/cm²</i>	<i>Appréciation</i>
1	3	O157:H7	$6,9 \cdot 10^1$	NA
2	<1	O157:H7	$6,9 \cdot 10^{-1}$	S
3	>5	O157:H-	$3,4 \cdot 10^1$	NA
4	>5	O157:H-	$1,6 \cdot 10^2$	NA
5	4	O157:H-	$3,4 \cdot 10^2$	NA
6	<1	O157:H-	$8,4 \cdot 10^1$	NA
7	<1	O157:H-	$1,3 \cdot 10^2$	NA
8	<1	O157:H-	$2,4 \cdot 10^1$	NA
9	<1	O157:H-	$0,8 \cdot 10^{-1}$	S
10	<1	O157:H-	$8,9 \cdot 10^0$	A
11	1	O157:H-	$1,7 \cdot 10^0$	A
12	<1	O157:H-	$6,5 \cdot 10^0$	A
13	2	O157:H-	$1,1 \cdot 10^2$	NA
14	2	O157:H-	$2,5 \cdot 10^1$	NA
15	4	O157:H-	$1,3 \cdot 10^0$	A
16	<1	O157:H-	$7,1 \cdot 10^0$	A
17	<1	O157:H-	$8,3 \cdot 10^1$	NA
18	4	O157:H-	$7,6 \cdot 10^0$	A

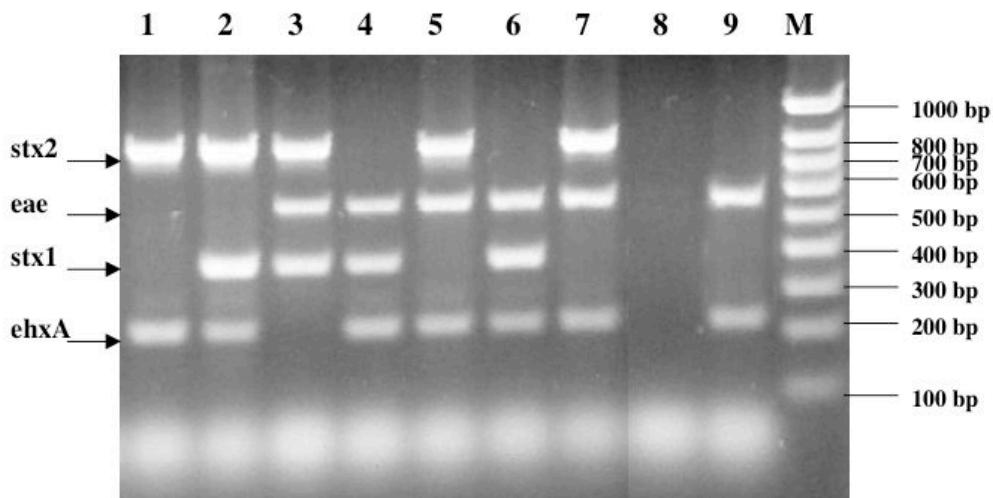
ufc : unité formant colonies, NA: non acceptable, A: acceptable

Tableau IV.3. Caractéristiques des échantillons ayant permis l'isolement d'un STEC O157 à partir des carcasses de bœuf en Algérie

La présence des *E. coli* O157 a été détectée sur 18 carcasses des 230 testées soit une prévalence de 7,8 %. Aucune corrélation n'a pu être établie entre le nombre d'*E. coli/cm²* et la présence d'*E. coli* de sérotype O157. Le niveau de contamination par *E. coli* des carcasses ayant révélé la présence d'un STEC O157 est variable et la présence de STEC O157 n'est pas plus fréquente sur les carcasses les plus contaminées par *E. coli*.

3. Caractérisation des souches isolées par PCR multiplex

Le pathotype des STEC O157 a été déterminé par PCR multiplex classique. Cette technique a d'abord été validée sur des souches de référence (Figure IV.3) et ensuite appliquée aux souches STEC isolées dans cette étude.



Après PCR, les amplicons ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. 1. Souche 211; 2. Souche 309S89; 3. Souche 317S89; 4. Souche EH248; 5. Souche EH298; 6. Souche EH291; 7. Souche EH296; 8. Blanc; 9. Souche ATCC43888. M: marqueur de poids moléculaire, les tailles des fragments sont indiquées. Les flèches indiquent les amplicons attendus: *stx2* (807 bp), *eae* (570 bp), *stx1* (388 bp) and *ehxA* (233 bp).

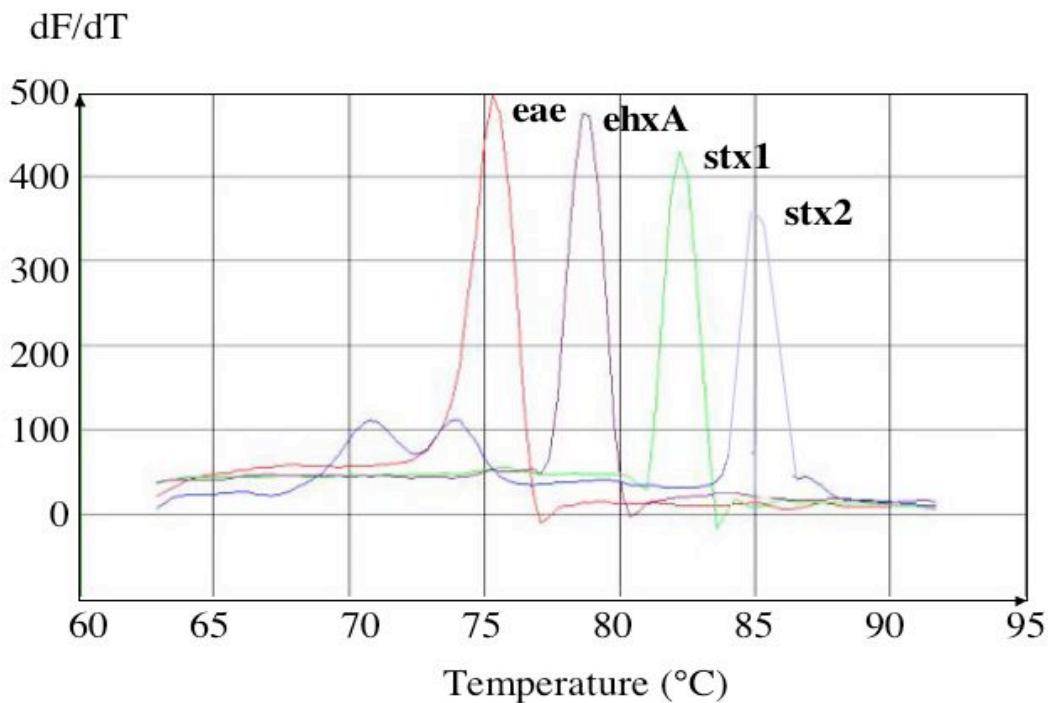
Figure IV.3. Détermination du pathotype par PCR multiplex classique

Parmi les dix-huit souches de *E. coli* O157 testées, 16 (88,9 %) possèdent le gène *stx* dont 14 (78 %) sont *stx₂*, *eae*, *ehxA*; une est *stx₁* et *stx₂*, *eae*, *ehxA*, une est *stx₁*, *eae*, *ehxA*. Toutes possèdent donc les gènes *eae* et *ehxA*. Ces souches sont toutes potentiellement pathogènes pour l'homme (tableau IV.4). Une seule produit seulement la toxine Stx₁. Cette toxine est moins fréquemment associée au sérotype O157:H7/H- mais plus fréquemment exprimée par les autres sérotypes. Les souches produisant Stx₁ sont moins virulentes que celles qui expriment Stx₂ ou Stx₁ et Stx₂ (Barkocy et al, 2004). Deux souches d'*E. coli* O157, *stx-*, *eae+*, *ehxA+* ont aussi été isolées au cours de cette étude.

<i>Pathotypes</i>	<i>Nombre de souches</i>
<i>eae stx₂ ehxA</i>	14
<i>eae stx₁ stx₂ ehxA</i>	1
<i>eae stx₁ ehxA</i>	1
<i>eae stx- ehxA</i>	2

Tableau IV.4. Pathotypes des *E. coli* O157 isolés en Algérie à partir des carcasses de boeuf

Un test similaire a été mené par PCR en temps réel par amplification des gènes *eae*, *stx₁*, *stx₂* et *ehxA*. Après dissociation, les 4 pics sont bien séparés (figure IV.4.). Les résultats de PCR classiques et par PCR en temps réel ont été identiques.



Variation de fluorescence (dF) en fonction de la température (°C). Chaque pic correspond à un amplicon (*stx₂*, *stx₁*, *ehxA* ou *eae*).

Figure IV.4. Résultats de la PCR en temps réel multiplex pour une souche *stx₁*, *stx₂*, *eae* et *ehxA* positive.

4. Résultats de la recherche des autres sérotypes de STEC/AEEC

Deux mille trois cent colonies isolées soit 10 colonies par échantillon ($n=230$) ont été testées par hybridation ADN/ADN sur colonies pour les gènes *stx₁*, *stx₂* et *eae*.

Soixante six colonies (2,8 %) possédant au moins un des gènes recherchés ont été mises en évidence à partir de 30 carcasses (13 %) (Tableau IV.5). Sur les 66 colonies isolées, 40 sont des *E. coli* entéropathogènes (*eae+*, *stx-*); 23 *E. coli* sont positifs pour *stx* et négatifs pour *eae* et trois présentent le pathotype des EHEC (*eae+*; *stx+*). Ces dernières ont été isolées à partir d'une même carcasse. Aucune souche n'a agglutiné les sérums anti (O26, O111, O128, O103 O91, O145) considérés comme les plus importants.

Carcasses	Pathotypes
1	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
2	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
3	<i>4x eae+ stx1- stx2-</i>
4	<i>1x eae- stx1+ stx2-</i>
5	<i>1 x eae- stx1- stx2+</i>
6	<i>2x eae- stx1+ stx2- 1x eae- stx1- stx2+</i>
7	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
8	<i>5x eae+ stx1- stx2-</i>
9	<i>1x eae- stx1+ stx2-</i>
10	<i>9x eae+ stx1- stx2-</i>
11	<i>3x eae- stx1+ stx2+</i>
12	<i>1x eae- stx1- stx2+ ; 8 x eae+ stx1- stx2-</i>
13	<i>1x eae- stx1+ stx2+ 1 x eae- stx1- stx2+</i>
14	<i>1x eae- stx1+ stx2- ;</i>
15	<i>1 x eae- stx1- stx2+</i>
16	<i>1 x eae+ stx1- stx2-</i>
17	<i>3x eae+ stx1+ stx2-; 1x eae- stx1+ stx2-</i>
18	<i>1x eae- stx1+ stx2-;</i>
19	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
20	<i>1x eae- stx1+ stx2-</i>
21	<i>1x eae- stx1- stx2+</i>
22	<i>2x eae+ stx1- stx2-</i>
23	<i>2x eae- stx1- stx2+</i>
24	<i>1x eae- stx1- stx2+</i>
25	<i>3x eae+ stx1- stx2-</i>
26	<i>2x eae+ stx1- stx2-</i>
27	<i>1x eae- stx1- stx2+</i>
28	<i>1x eae- stx1+ stx2-</i>
29	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
30	<i>1x eae+ stx1- stx2-</i>
30/320 (13%)	66 colonies différentes dont cinq pathotypes : 40 (60, 6%) : <i>eae+, stx1- stx2-</i> , 10 (15, 2%) : <i>eae -, stx1- stx2+</i> , 9 (13, 6%) : <i>eae-, stx1+ stx2-</i> , 4(6, 1%) : <i>eae-, stx1+, stx2+</i> , 3 (4, 5%) : <i>eae+ stx1+, stx2-</i> .

Tableau IV.5 Pathotypes des souches STEC/AEEC non-O157 isolées de carcasses.

Contrairement aux STEC O157, il n'existe pas de méthode standard pour la détection des autres sérotypes de STEC. Lors de cette étude, l'utilisation de la méthode d'hybridation ADN/ADN sur colonies a permis de mettre en évidence les gènes recherchés: *stx₁*, *stx₂* et *eae*.

Au moins 3 % (66/2300) des colonies testées sont positives pour au moins un des gènes testés. Quarante souches (60,6 %) ont présenté le pathotype (*stx-*, *eae+*) des *E. coli* entéropathogènes. Le deuxième pathotype (34,8 %) mis en évidence est celui des *E. coli* vérocytotoxinogènes (*stx+*, *eae*). Trois colonies seulement, isolées à partir de la même carcasse ont présenté le pathotype des STEC pathogènes pour l'homme ou EHEC (*stx+; eae+*). Ces souches n'appartiennent à aucun des sérotypes O26, O91, O103, O111, O128, O145 ou O157 après agglutination avec les sérum correspondants.

D'un point de vue méthodologique, l'isolement des souches de sérotype non-O157 reste un problème en l'absence de milieux spécifiques. Cependant des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-O26, O145, O128 et O91 existent (Dynabeads, Invitrogen) et pourraient être utilisées dans l'étape d'enrichissement pour rechercher ces sérotypes de STEC non-O157. Ensuite, un isolement sur une gélose entérohémolysine (Beutin et al, 1996) ou sur un milieu Mac Conkey classique pourraient être envisagé. D'autre part, des milieux sélectifs pour d'autres sérotypes sont en cours de développement (Possé et al., 2006, cataramé, 2003).

Le typage des souches par PCR multiplex est assez facile et rapide. Son équivalent en PCR en temps réel rend cette technique accessible aux laboratoires de routine puisqu'elle évite l'étape de la détection sur gel et la manipulation du bromure d'éthidium.