

**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

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ces études était d'une part d'étudier la prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires produites en Belgique pour permettre à l'IEV puis l'AFSCA de positionner les produits belges au niveau européen et dans le contexte mondial et d'autre part, d'évaluer la situation des STEC O157 en Algérie au niveau des filières de production bovine et ovine.

En Belgique, les résultats obtenus ont permis de suivre l'évolution de ces pathogènes au cours de plusieurs années dans certaines matrices et de renforcer la surveillance des STEC O157 dans la filière de production considérée comme la plus à risque, la filière bovine. Parallèlement, le développement de la méthodologie de recherche des STEC O157 ainsi que le typage des souches isolées dans le pays ont permis d'améliorer le niveau de détection de ces pathogènes. La mise en place de systèmes d'alerte et de mesures actives, suite à la présence de ces pathogènes, ont permis d'évaluer l'efficacité des programmes de surveillance. Une approche objective de la situation peut être déduite à partir des résultats et des données collectées au niveau belge et au niveau européen. Le but est d'aboutir à la mise en place de stratégies de prévention afin d'éviter la dissémination de ces agents pathogènes. Parallèlement à la surveillance des agents zoonotiques, ces plans ont permis d'évaluer le niveau d'hygiène des différentes filières de productions de denrées alimentaires. Le couplage des études avec un indicateur de contamination fécale a permis de réaliser une étude plus critique des résultats.

En Algérie, cette étude fut la première du genre. Les résultats ont permis de mettre en évidence d'une part la présence des STEC O157 dans les filières bovine et ovine et d'évaluer le niveau d'hygiène, au niveau de la production, sur les surfaces de carcasses destinées à la consommation.

1. Organisation et évolution des plans de surveillance des STEC en Belgique

Dans le cadre de la Directive Européenne 92/117/CEE (Anonyme, 1992), Tous les Etats-membres (n=15) étaient chargés de collecter les données concernant les agents zoonotiques chez l'homme, les animaux et les denrées alimentaires, de les transmettre et d'en faire rapport annuellement au Comité Vétérinaire Permanent et à la Commission européenne.

L'objectif étant d'arriver à une harmonisation des systèmes de surveillance, de collecter et de centraliser toutes les données épidémiologiques.

Une première évaluation (SANCO/4320/2001) du système de surveillance des STEC dans les denrées alimentaires d'origine animale dans les états membres de la CEE a permis de décrire la situation et

d'émettre un certain nombre de remarques. Dans la majorité des Etats-membres, les services responsables de la santé animale et du contrôle alimentaire sont sous la tutelle d'un ou de deux ministères. Ces services sont représentés dans le pays au niveau local, national et aussi à l'échelle de la région. Depuis une dizaine d'années, en réponse au développement et à la mondialisation des échanges commerciaux et suite à l'apparition des différentes crises (dioxine, ESB) qui ont secoué le monde, des structures spécifiques (agences) ont été créées dans certains pays pour coordonner les programmes d'analyses, d'évaluation et de gestion du risque.

En Belgique, l'institution chargée du contrôle et de l'inspection des denrées alimentaires d'origine animale et de la santé animale était représentée à l'origine par l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV) et, depuis 2000 à ce jour par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA)

L'AFSCA a pour mission de veiller à la sécurité de la chaîne alimentaire et à la qualité des denrées alimentaires afin de préserver la santé du consommateur. L'agence est entre autres compétente pour le contrôle, l'expertise et l'examen des denrées alimentaires et des matières premières à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, ainsi que des méthodes de production, du transport, de l'emballage, de l'importation et de l'exportation. A cette fin, ces agences agissent en collaboration avec des laboratoires de références officiellement désignés pour mener toutes les investigations nécessaires à la réalisation des programmes de surveillance. Ainsi, les contrôles portant sur les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) ou *E. coli* vérocytotoxinogènes (VTEC) entrent sous la compétence de l'AFSCA (SANCO/3173/2001). Les laboratoires qui participent aux plans de surveillance des STEC dans les denrées alimentaires sont les laboratoires de référence de l'ULg et de l'UZ-Brussel, les laboratoires de l'université de Gand et de l'Institut de Santé Publique (ISP-LP), et plus récemment les deux laboratoires de l'AFSCA. Le laboratoire de l'ULg est le point de contact belge du laboratoire communautaire de référence institué à Rome.

Les plans de surveillance des STEC et autres agents zoonotiques chez l'homme, l'animal et dans les aliments ont été mis en place progressivement. Tous les états membres de l'UE n'étaient pas au même niveau de surveillance et d'informations, les priorités et les actions menées étaient différentes.

Pour exemple, certains pays comme la Suède, le Danemark, l'Allemagne et la Belgique ont désigné des laboratoires de nationaux de référence (généralement laboratoires de référence pour les maladies gastrointestinales) pour le contrôle et le dépistage des STEC en milieu hospitalier. Ces laboratoires ont pour mission, le développement de méthodes de diagnostic et de typage moléculaire des souches pathogènes. En France, une surveillance des cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans est menée depuis 1993. La notification des cas d'infections humaines (maladies, décès, et portage) à STEC est obligatoire en Suède depuis 1996 et depuis 1998 en Allemagne et au Danemark.

Au niveau de la santé animale, la Suède est le premier pays à avoir pris des mesures officielles de surveillance des STEC dans les élevages notamment lorsqu'ils sont directement associés à un cas d'infection humaine. L'obligation de notification aux services officiels lorsque des souches STEC O157 sont isolées chez les animaux date d'octobre 1996. Dès lors, la circulation d'animaux de troupeaux infectés est interdite. Des mesures de nettoyage et de désinfection sont entreprises dans les élevages et l'interdiction n'est levée que si les résultats du dépistage des STEC O157 à intervalles réguliers chez l'animal sont négatifs (deux tests négatifs à intervalle de 3 mois). L'année suivante, en 1997, le Danemark, la Finlande et la France ont adopté le même système et mis en place officiellement leur programme de surveillance de STEC O157 chez les animaux. (European Commission, SANCO/4320/2001)

La Belgique n'avait pas de programme similaire. Cependant des enquêtes volontaires portant sur le dépistage des STEC chez les animaux (bovins) avaient été initiées dans le pays dès le début des années 90 (Pohl et al., 1991; Pohl et al., 1994).

En ce qui concerne les denrées alimentaires, La surveillance des STEC dans le secteur de production des denrées alimentaires a commencé en application de la directive 92/117/CEE. Dès lors, les données collectées au niveau des états membres sont présentées chaque année depuis 1999 dans le rapport «Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway» et les rapports de l'EFSA depuis 2002.

La Belgique a mis en place les plans de surveillance des agents zoonotiques dans les denrées alimentaires y compris de STEC O157 dès 1997 (étude III). Dès que la présence de l'agent pathogène est confirmée dans une denrée alimentaire, un système d'alerte est enclenché. La recherche de l'agent pathogène est effectuée au niveau des élevages de provenance qui sont identifiés grâce à l'efficacité du système de traçabilité «SANITEL». Le dépistage est effectué chez au moins 10 % des animaux (au niveau des matières fécales), dans leurs aliments et dans l'environnement (poussières).

Les animaux destinés à l'abattoir sont systématiquement échantillonnés. La consommation de lait cru et produits dérivés est interdite.

En ce qui concerne les produits laitiers, la Belgique, la France et l'Allemagne ont accordé un intérêt particulier au dépistage des STEC dans les productions de fromages fabriqués à partir de lait cru.

Dans la majorité des états membres, les programmes de surveillance sont orientés vers seulement la détection du sérotype O157 à l'exception de l'Allemagne et de la France qui recherchent en plus les autres sérotypes de STEC. De ce fait, très peu de données sont transmises et la prévalence de ces derniers est souvent sous-estimée.

Les premiers rapports transmis par chaque pays ont montré une hétérogénéité au niveau des données collectées, des priorités, des actions, des procédures entreprises et au niveau de la méthodologie de recherche des STEC et autres agents pathogènes (choix des matrices, plans d'échantillonnage méthodes de détection). De plus, quelques insuffisances dans la nomenclature adoptée dans les rapports ont été relevées. De ce fait, il était difficile de comparer les résultats et d'avoir une interprétation homogène et objective de la situation en Europe durant les premières années de surveillance. Par conséquent, il fallait harmoniser les programmes de surveillance au niveau des plans d'échantillonnages pour les différentes matrices à analyser, des méthodes de détection et de recherche des STEC O157 et autres sérotypes de STEC. Il était aussi important que les actions et les recherches menées dans les Etats-membres soient coordonnées et que les résultats soient correctement transmis et statistiquement valides. Pour ce faire, un manuel de présentation (*Manuel for Reporting on Trends and Sources of Zoonotic Agents in animals, feedingstuffs, food, and man in the EU in 1999*) a été diffusé par le laboratoire communautaire de référence de Berlin. Dans ce rapport, des définitions, des recommandations au niveau des objectifs et de la méthodologie de recherche pour chaque agent zoonotique ont été précisées. L'objectif étant d'aboutir à une harmonisation dans la rédaction des rapports de surveillance pour chaque état membre afin de mieux comparer les données collectées. Dans ce manuel, il était recommandé de préciser les méthodes de diagnostic pour les STEC O157 et de rechercher d'autres sérotypes principalement STEC O111, O103 et O26 dans les aliments, chez l'homme et chez les animaux. Chaque Etat-membre devait estimer la prévalence de ces agents pathogènes dans toutes les denrées alimentaires présentant un risque et particulièrement au niveau de la filière bovine (à l'abattoir et au stade de la distribution). Des investigations supplémentaires de recherche dans d'autres matrices n'étaient pas exclues.

L'élaboration d'une norme ISO16.654 (ISO, 2001) pour la détection des STEC O157 devait permettre d'harmoniser les méthodes de détection et aboutir à une évaluation objective des résultats enregistrés.

Cependant le choix des méthodes de diagnostic des STEC non O157 reste encore à l'heure actuelle problématique. De même, les résultats des typages moléculaires des souches isolées devaient être transmis par les laboratoires nationaux de référence pour les enquêtes épidémiologiques et pour comparer les souches circulantes.

Suite à l'apparition de nouveaux textes réglementaires, les programmes de surveillance des agents zoonotiques ont connu une certaine évolution. Les entreprises de production de viande hachée et de produits carnés de bœuf ont intégré dans leurs plans HACCP, la maîtrise et le dépistage du danger lié à STEC O157 avec obligation de déclaration en cas de détection, application de mesures correctives pour éliminer le pathogène et vérification de l'efficacité des plans.

En 2001, la décision 2001/471/CEE (Anonyme, 2001) entérine la mise en place des principes du système HACCP au niveau des entreprises productrices de viandes rouges et recommande l'utilisation de tests microbiologiques comme outil d'évaluation de l'hygiène des carcasses de bœuf. Des critères microbiologiques sont établis et en cas de dépassement, des mesures correctives au niveau des points critiques sont menées.

En 2004, de nouvelles stratégies mettent l'accent sur la nécessité de renforcer les systèmes mis en place et de contrôler les agents zoonotiques à la base c'est à dire au niveau de la production primaire conformément à la nouvelle directive européenne 2003/99/CEE, (Anonyme, 2003) modifiant la décision 90/424/CEE du conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE (Anonyme, 1992). Ainsi, les systèmes de surveillance sont sous la responsabilité des Etats-membres et s'appliquent au niveau de la production primaire et/ou d'autres stades de la chaîne alimentaire. Ces systèmes collectent, analysent et diffusent les données relatives à ces phénomènes (facilitent l'échange d'informations). L'objectif est d'identifier et de caractériser les dangers, d'évaluer l'exposition et définir les risques qui y sont liés. L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fournit des avis scientifiques indépendants sur toutes les questions ayant un impact direct ou indirect sur la sécurité alimentaire y compris la santé et le bien-être des animaux et la protection des plantes. Les évaluations des risques réalisées par l'EFSA fournissent aux gestionnaires des risques (composés des institutions européennes responsables politiquement, c'est-à-dire la Commission Européenne, le Parlement Européen et le Conseil) des bases scientifiques solides pour définir des mesures réglementaires ou législatives à orientation politique nécessaires à la garantie d'un niveau élevé de protection des consommateurs eu égard à la sécurité des aliments.

La collecte et l'analyse de données scientifiques, l'identification des risques émergents et l'assistance scientifique à la Commission, notamment en cas de crise alimentaire, font également partie de la mission de l'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA), comme le prévoit son règlement fondateur 2002/178/EC (CE, 2002) (http://europa.eu/agencies/communityagencies/efsa/index_fr.htm, mis à jour 16 octobre 2006).

Enfin, depuis le 1^{er} janvier 2006, le Règlement (CE) N°2073/2005/CE relatif aux critères microbiologiques dans la chaîne alimentaire fixe des critères de sécurité des denrées alimentaires qui doivent obligatoirement être respectés par tous les opérateurs au sein de l'UE. Aucun critère relatif aux STEC n'y est repris. La réduction du risque lié aux STEC est uniquement basée sur l'obligation de respecter des critères d'hygiène des processus à des étapes-clé de la filière, à savoir minimiser la contamination fécale vérifiée par le dénombrement des entérobactéries ou des *E. coli*.

1.1. Méthodologie de recherche:

1.1.1. Les plans d'échantillonnage

L'échantillonnage est aussi important pour la collecte des données que pour l'analyse et l'interprétation des résultats. Il doit symboliser une image représentative de la production et de la distribution, particulièrement pour les produits finis. Pour chaque produit, il doit être représentatif de la diversité géographique des entreprises et de leur approvisionnement en matières premières et de la répartition temporelle. Le choix des matrices est effectué en fonction du type et de l'importance des denrées produites dans le pays conformément aux indications mentionnées dans les formulaires communiqués par le laboratoire communautaire de référence de Berlin et plus récemment par l'EFSA pour la collecte des résultats en application des directives 92/117/CE et 2003/99/CE et aussi en fonction des données de prévalence disponibles dans la littérature. Des tableaux spécifiques à l'usage de la sélection aléatoire des firmes et exploitations à échantillonner ont été établis au niveau de l'administration centrale de l'I.E.V et de l'AFSCA. Des éléments de base ont été utilisés pour la sélection des entreprises comme les cercles d'appartenance à l'IEV ou les provinces pour l'AFSCA, le numéro d'agrément de chaque firme (identification et type d'activité), le nom et adresse de la firme, l'importance chiffrée de son activité en tonnages ou en nombres d'abattages afin de déterminer le nombre proportionnel d'échantillons à prélever. Un minimum de 5 échantillons indépendants par entreprise a été prélevé sur une année et une pondération globale du nombre d'échantillons par rapport aux volumes de production a été réalisée pour chaque entreprise.

Par exemple, le nombre de carcasses de porc analysé en 2000 représentait 0,0015 % de la production annuelle. Pour le bœuf, le nombre de carcasses testées était égal à 1984 en 1999, 1501 en 2000 ; 1388 en 2001; 1215 en 2002 et 1479 en 2003 et 1337 en 2004 soit 0,35 %; 0,25 %; 0,23 % ; 0,19 % ; 0,26 % et 0,22 % de la production annuelle. Pour les viandes de découpe de bœuf, le nombre d'échantillons testés était égal à 222 en 2002 et 285 en 2004 pour une production annuelle de 30.000 tonnes de viandes. Les carcasses de poules analysées en 2001 représentaient 0,0007 % de la production annuelle belge.

1.1.2. Le choix des entreprises échantillonnées

L'échantillonnage a ciblé les entreprises dont le nombre d'abattage annuel est supérieur à 300 carcasses bovines soit 53 entreprises échantillonnées à raison de 10 passages (nombre d'abattages supérieurs à 10.000 par année) et 5 passages (nombre d'abattages compris entre 300 et 10.000) par année).

Trente huit établissements dont le nombre d'abattage annuel est supérieur à 20.000 porcs ont été retenus pour le total de 300 prélèvements (n=163). Pour les prélèvements de poules et poulets, le seuil

de production a été fixé à 200 000 abattages annuels, cinq établissements correspondent à ces critères. En ce qui concerne les découpes de poulets (filets), le choix a porté sur quatre exploitations par équipe néerlandophone et deux exploitations par équipe francophone à raison de cinq passages par établissement. Les matrices de viandes hachées ont été prélevées lors de cinq passages en ateliers de transformation. Toutes les autres matrices, prélevées dans le secteur de la distribution et ont été le fruit du hasard des passages dans une région tout en tenant compte d'une proportionnalité établie au départ entre les boucheries, grandes surfaces, selon leur importance de débit.

1.1.3. La procédure d'échantillonnage:

De nombreuses méthodes d'échantillonnage (excision, rinçage des carcasses, utilisation de boîtes de contact) permettent d'évaluer la qualité bactériologique des carcasses de bovins, ovins, porcins et volailles à la production. La méthode par excision ou méthode destructrice est considérée comme la méthode la plus représentative car elle permet de récupérer le maximum de bactéries néanmoins sa pratique dévalue la valeur marchande du produit (Capita *et al*, 2004). Les deux méthodes présentent des avantages et des inconvénients. Toutes deux entrent en considération pour l'échantillonnage de carcasses dans le cadre du contrôle des critères d'hygiène des procédés (Règlement 2073/2005/CE)

Au cours de notre étude, nous avons utilisé la méthode d'écouvillonnage non destructive autorisée par la décision 2001/471/CE (Anonyme, 2001) qui consiste en un double écouvillonnage des surfaces de carcasses au niveau de sites spécifiques (études I, III, IV et V). Cette méthode non destructive est d'application directe et est facile à utiliser dans les plans HACCP pour vérifier que les critères microbiologiques sont bien atteints. Elle présente aussi l'avantage de pouvoir étudier un grand nombre de carcasses d'un lot en regroupant les écouvillons de plusieurs carcasses dans un même échantillon mais aussi de détecter de faibles niveaux d'*E. coli* O157 ou autres bactéries pathogènes à partir de plus grandes surfaces de carcasses pendant la période de refroidissement (Capita *et al*, 2004).

La nature de l'écouvillon utilisé influence le nombre de germes récupérés. Plus l'écouvillon est abrasif plus le nombre de germes récupérés est élevé. La technique du double écouvillonnage à l'aide de cotons ne permet de récupérer que 1 à 89 % des bactéries retrouvées après excision (Pepperell *et al.*, 2005). Avec les écouvillons d'ouate, une forte amélioration de la récupération peut être obtenue en utilisant successivement un écouvillon humide et un écouvillon sec. D'autres études (Hutchison, 2005) ont montré que la corrélation linéaire entre les dénombrements de bactéries (flore totale) obtenues avec les deux techniques est faible et qu'aucun facteur de conversion du nombre de bactéries pour chacune des techniques d'échantillonnage n'a pu être établi.

La différence des dénombrements entre les deux méthodes (destructrice et non destructrice) est essentiellement liée au degré d'adhérence des bactéries à la surface de la carcasse. Cette adhérence est influencée par de nombreux facteurs (type de tissu, niveau de contamination, degré d'humidité) (Gill, 2001). L'échantillonnage des carcasses doit être réalisé après les étapes de finition (habillage) car l'adhésion de la bactérie à la surface de carcasses devient irréversible dans un temps compris entre 30 mn à plusieurs heures après la préparation de celles-ci. Par ailleurs, l'adhésion des bactéries aux écouvillons dans la solution d'enrichissement doit être prise en compte d'où l'intérêt d'homogénéiser la suspension cotons/ diluant afin de les détacher (Pepperell R. *et al*, 2005).

Les sites écouvillonnés au niveau des carcasses sont considérés comme les plus représentatifs de la contamination par *E. coli*. (Décision 2001/471/CE, Anonyme, 2001). La répartition des germes n'est pas uniforme au niveau de la carcasse et la partie postérieure est moins contaminée que la partie antérieure. Cependant les bactéries sont redistribuées des sites les plus contaminés vers les moins contaminés après le dépouillement et la fente (Gill et Baker, 1998). La norme ISO17.604 tente de standardiser l'approche sans la figer pour pouvoir tenir compte des pratiques locales d'abattage. L'utilisation d'un indicateur de contamination fécale permet d'évaluer l'hygiène des opérations d'abattage notamment après l'éviscération et la fente de la carcasse.

1.1.4. Les méthodes de recherche des STEC O157

Au début des plans de surveillance, les méthodes d'isolement des STEC O157 étaient toutes basées sur une étape de pré-enrichissement de courte durée dans un bouillon non sélectif, une immunoconcentration par la méthode de séparation immunomagnétique, un enrichissement sélectif suivi d'une détection de l'antigène somatique O157 (de tests immunologiques), un isolement sur milieu sélectif MacConkey au sorbitol avec ou sans cefixime tellurite (CT-SMAC ou SMAC). Le sérotype était confirmé par agglutination au latex anti O157, l'appartenance à l'espèce *E. coli* par utilisation de galeries biochimiques API 20E (BioMérieux) et les gènes de virulence (*stx* et *eae*) par PCR (Piérard, 1997a).

De nombreux milieux d'enrichissement ont été étudiés pour permettre aux cellules bactériennes de se multiplier jusqu'à un niveau détectable (Vernozy-Rozand et Gueniot, 1997a). L'utilisation du bouillon trypticase soja modifié additionné de novobiocine (De Boer, 2000) ou du bouillon peptoné tamponné additionné de vancomycine (Ogden 2001), permettent une meilleure détection de STEC O157 dans les aliments. De même, l'utilisation du bouillon *E.coli* modifié additionné de novobiocine est couramment pratiquée dans les protocoles d'enrichissement des entérobactéries. Les sels biliaires présents inhibent la flore compétitive. Dans 60 % des cas, un antibiotique est ajouté au bouillon d'enrichissement. La novobiocine est l'antibiotique le plus indiqué car il inhibe la croissance des

bactéries à Gram positifs et celle de quelques bactéries à Gram négatifs qui contrecarreraient le développement des STEC. Les bouillons d'enrichissement sont incubés en routine à une température égale à 35°C ou 37°C pendant 16 à 24 heures (Vimont, 2006). Des températures comprise entre 40°C (Nauta et al., 1999) ou une température de 41°C-42°C sont considérées comme la température optimale des STEC O157 (De Boer, 2000, Ogden, 2001). Cependant dans la norme ISO/EN 16654, un enrichissement d'une courte durée d'incubation (6 heures) à 41°C (+/- 1°C) est recommandé.

L'absence de détection de l'antigène O157 par la méthode immunoenzymatique (VIDAS ECO de BioMérieux) permet de dire que *E. coli* O157:H7 n'est pas présent dans la prise d'essai utilisée pour l'analyse. Par contre sa détection ne signe pas la présence obligatoire de STEC O157:H7 dans l'aliment. Avec ce test et avec l'ensemble des tests immuno enzymatiques actuellement commercialisés pour détecter ce pathogène, on peut avoir une réponse positive avec certaines souches d'*Hafnia alvei*, de *Citrobacter freundii* et de *Yersinia enterocolitica* séro groupe O:9 ainsi qu'avec *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Pseudomonas maltophilia* 555 (actuellement *Stenotrophomonas maltophilia*) (AFSSA, 2003) et des souches non virulentes d'*E. coli* O157.

La modification de la méthode analytique en 1998 (méthode SP-VG M001) a permis aux laboratoires de diminuer la prévalence des faux positifs tout en conservant un seuil de détection bas (1 à 5 ufc/25g). Cette méthode prévoit, après des étapes d'enrichissement plus sélectives, la détection de l'antigène somatique O157 par l'utilisation de tests immunologiques (VIDAS ECO de BioMérieux) avant l'immunoconcentration de la bactérie cible et son isolement sur des milieux spécifiques sélectifs. Un isolement réalisé directement à partir d'un bouillon d'enrichissement peu sélectif ne peut que gêner la détection du pathogène et entraîner des résultats faussement négatifs, les colonies dites suspectes étant en effet difficiles à distinguer dans des boîtes souvent trop chargées en colonies. L'utilisation de billes magnétiques anti *E. coli* O157 provoquent un enrichissement significatif en faveur des bactéries arborant l'antigène O157 : un rapport initial *E. coli* O157 sur flore entérique de 1 sur 20 est souvent réduit à 1 sur 1 ou 1 sur 2 soit un facteur d'enrichissement de 10 à 20.

Le milieu CT-SMAC (Sorbitol Mac Conkey à la cefixime et au tellurite) est le milieu d'isolement le plus sélectif comparativement aux autres milieux (SMAC ou C-SMAC). L'adjonction du tellurite et de la cefixime réduit la croissance des bactéries compétitives parfois porteuses de l'antigène O157. Le tellurite inhibe la croissance d'*E. coli* non O157 tandis que la cefixime inhibe la croissance de *Proteus* (Zadik et al., 1993). Dès lors que les colonies suspectes sont repérées sur les milieux gélosés utilisés, il est procédé à une étape de confirmation des colonies suspectes soit : agglutination de la présence de l'antigène O157, appartenance à l'espèce *E. coli*, recherche des shigatoxines par des tests immunologiques. L'utilisation de la PCR a permis la détection des gènes *stx*₁, *stx*₂ et leurs variants (Piérard et al., 1997a; Karch et Meyer, 1989); des gènes *eae* (Piérard et al., 1997a; China et al., 1996;

Gannon *et al.*, 1993). La recherche de l'entérohémolysine a été testée sur gélose au sang + CaCl₂ (Piérard *et al.*, 1997; Beutin *et al.*, 1989) puis par PCR multiplex (Chahed *et al.*, 2006).

En résumé c'est la conjonction d'un milieu d'enrichissement très sélectif avec un immuno-enrichissement et un isolement sur un milieu tout aussi sélectif qui permet d'augmenter sensiblement la sensibilité de la méthode par rapport aux méthodes utilisées lors des études préliminaires et même, mais dans une moindre mesure, par rapport à la méthode ISO16.654 qui ne prévoit qu'un préenrichissement non sélectif. Des milieux chromogènes spécifiques permettent encore d'améliorer les performances.

1.1.5. La détection des STEC non O157

Les STEC n'ont pas de propriétés biochimiques communes permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite le recours à des méthodes génétiques dont la PCR avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes de virulence codant pour la production de Shigatoxines (*stx*), de l'intimine (*eae*) et de l'entérohémolysine (*ehxA*). L'utilisation de sondes d'ADN radioactives utilisées pour la détection de gènes de virulence présente l'avantage d'être sensible et spécifique (Karch *et al.*, 1989). Cette méthode d'hybridations ADN/ADN sur colonies a permis de tester un grand nombre de colonies isolées à partir de bouillons d'enrichissement provenant d'échantillons de viandes hachées (étude II) ou de carcasses (étude IV). Cependant elle présente également un certain nombre d'inconvénients comme des délais d'attente trop longs et la manipulation de la radioactivité (Bouvet *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle, Il n'y a pas de méthodes validées permettant la détection des STEC non-O157. Elles restent de ce fait limitées aux laboratoires de recherche. Après isolement des souches possédant un ou plusieurs facteurs de virulence, la détermination des sérotypes est effectuée par l'utilisation des antisérums correspondants aux sérotypes les plus fréquemment isolés lors d'infections à STEC chez l'homme: O157, O26, O103 et O111. L'utilisation de billes magnétiques anti EPEC/STEC permet de détecter après séparation immuno-magnétique, les sérotypes (O26, O111, O118, O91, O145) les plus fréquemment impliqués dans les cas d'infections à STEC (Dynabeads, Invitrogen). Un isolement sur une gélose appropriée (EHEC Agar) (Hudson, 2000) ou autres géloses (Chromocult agar additionné de cefixime (50µg/ml), de cefsulodine (5mg) et vancomycine (8 mg) pour la détection de STECO111 ou gélose Mac Conkey au rhamnose (20g) pour STECO26) (Catarama, 2003).

1.2. Prévalence des STEC en Belgique

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses épidémies liées aux STEC O157 et autres sérotypes ont été décrites dans de nombreux pays. Une augmentation des cas d'infections soit sous forme de cas sporadiques ou d'épidémies avait été observée durant les années nonante notamment aux Etats-unis au Royaume-Uni et dans d'autres pays

1.2.1. Historique ou rétrospective des premières études réalisée sur l'homme et les animaux en Belgique

En Belgique, aucune épidémie à STEC n'avait été détectée dans les années nonante. Néanmoins, les études préliminaires sur le sujet ont permis de collecter les premières données (Piérard *et al.*, 1990). Les premières souches humaines de STEC O157 ont été isolées pour la première fois en Belgique en 1987 à Leuven puis une deuxième au niveau du laboratoire de référence de l'Institut de la Santé Publique de Bruxelles.

Entre 1987 et 1988, la prévalence des STEC O157 (sorbitol-, *B*-glucuronidase-) détectés dans les matières fécales de patients (n=3.940) était de l'ordre de 0,2 % en Belgique, Une prévalence plus élevée (1,9 %) a été enregistrée au Canada et similaire au Royaume-Uni (0,5 %). La détection des STEC non O157 dans un plus faible nombre d'échantillons (332 matières fécales de patients) a permis de mettre en évidence d'autres sérotypes comme O2:K1:H6, O111:H-, O117:K1:H7 et O157:H- (Piérard *et al.*, 1990).

Ultérieurement, au cours des années nonante, la présence des gènes *stx a* été mise en évidence dans 177 prélèvements de matières fécales de patients (n=12.296) par PCR soit 1,02 %, avec confirmation des souches dans 143 prélèvements de selles soit une prévalence de 0,83 %. La prévalence des STEC O157 était de l'ordre de 0,17 %.

Les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines étaient classés en Belgique comme le troisième pathogène responsable de maladies entériques après *Salmonella spp* et *Campylobacter jejuni*. Une prédominance du sérotype O157 (*stx*₂ ou *stx*₂-*stx*₁; *eae* + *ehxA* +) a été observée. Les autres sérotypes d'EHEC les plus fréquemment isolés sont: O26, O103, O111 et O145 et la plupart possèdent le gène *stx*₁.

Les mêmes prévalences (0,1 à 0,5 %) ont été enregistrées dans d'autres pays d'Europe (STEC O157 ou non-O157) alors qu'au Canada et aux Etats-unis, elles étaient plus élevées variant de 0,4 à 2,9 % (Piérard *et al.*, 1997a).

Douze pourcents des cas d'infections à EHEC évoluent vers le syndrome hémolytique urémique particulièrement chez les enfants chez qui l'on a enregistré une incidence du SHU de l'ordre de 4,3 cas pour 100.000 enfants de moins que cinq ans et 1,8 cas pour 100.000 enfants de moins de 15 ans et 0,42 dans la tranche de la population restante.

Soixante pourcents des cas d'infections gastro-intestinales à *E. coli* sont liés aux STEC de sérotype O157:H7 et H-; O26:H11; O121:H-; O145:H-; O172:H-. Les souches STEC possèdent surtout le gène *stx*₂, le gène *eae* et produisent l'entérohémolysine (Piérard, 1997a).

En raison de l'hétérogénéité des méthodes de diagnostic des STEC utilisées dans les différents pays et régions, la comparaison est quelque peu difficile. Cependant, les différents rapports de l'UE indiquent une prédominance du sérotype O157 par rapport aux autres sérotypes de STEC non O157 dans certains pays (UK, Suède et Irlande) alors que dans d'autres pays, l'inverse est constaté. Les STEC non O157 sont plus importants en Australie (EC, 1999 à 2002).

Chez les animaux, douze souches d'*E. coli* O157 (1 %) ont été détectées parmi 1.038 souches isolées de selles de veaux et de bovins en Belgique. Toutes fermentent le sorbitol et deux possèdent le gène *stx* (une produit VT₂ (*stx*₂) et l'autre Vte (*stx*_{2e})) (Pohl *et al.*, 1994).

1.2.2. La prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires en Belgique

Une étude préliminaire a montré la présence de gènes *stx* dans 4,6 % des 2440 échantillons de viandes provenant de plusieurs espèces animales. Le gène *stx* a été retrouvé dans 1,8 % (n=1.532) des échantillons de bœuf et veaux, 4% (n=135) des échantillons de viandes ovines, 49 % (n=119) des échantillons de ruminants sauvages, dans 23 % (n=64) des échantillons issus d'autres mammifères sauvages; et dans 6 % (n=90) des échantillons d'oiseaux sauvages. Les nombreux sérotypes détectés au cours de cette étude sont les sérotypes O15:H27; O76:H19; O91:H-; O91:H14; O91:H21; O128:H2 et O145:H-, sérotypes moins fréquemment rencontrés chez des patients au contraire des sérotypes O157; O26; O103 et O111. Aucun STEC de sérotype O157 n'a été mis en évidence dans cette étude (Piérard, 1997 b).

1.2.2.1. Recherche des STEC O157 dans les viandes hachées et carcasses de bœufs au cours des deux premières études (I et II)

Dans le cadre de l'étude relative à l'évaluation de la contamination par des bactéries pathogènes des carcasses de bœuf et de porc, une souche STEC O157:H- (*stx*₁ et *stx*_{2vh-a}; *eae*+, *ehxA*+, sorbitol - et B-glucuronidase-) a été isolée à partir d'un échantillon regroupant les écouvillons de 5 demi-carcasses de bœuf. Il s'agit de la première souche STEC O157 pathogène isolée dans les denrées alimentaires en

Belgique. Deux autres souches *d'E.coli* O157 isolées à partir d'écouvillons de carcasses de porc étaient négatives pour les gènes de virulence. Ainsi, la présence de souches STEC O157 pathogènes dans les denrées alimentaires est bien établie en Belgique.

La viande hachée de bœuf représente le risque majeur d'infections à STEC à prendre en considération et la principale cible pour enclencher une surveillance des STEC pathogènes d'autant plus qu'elle est justifiée par les habitudes culinaires d'un pays où la viande hachée est consommée crue ou légèrement cuite. Aucun STEC O157 pathogène n'avait été détecté dans les 627 échantillons de viandes hachées analysés (étude II, 1996/1997). Deux souches *d'E. coli* O157 ont été isolées, mais aucune ne possédait les gènes de virulence *stx* et *eae*. Les gènes (*stx*⁺ et *eae*⁺) ont été mis en évidence par PCR dans 5 échantillons (n= 627) mais aucune souche STEC O157 n'avait pu être isolée.

Comme montré dans de nombreuses études, lorsque la PCR est réalisée à partir d'un milieu riche en matériel clinique ou lorsqu'il s'agit d'aliment, il est difficile d'isoler les souches STEC possédant les gènes détectés. Ce phénomène est probablement lié à la sensibilité de la technique qui peut détecter l'ADN d'une souche STEC parmi d'autres *E. coli* présents dans une proportion d'un STEC pour 10.000 bactéries (Piérard *et al.*, 1997a). Les résultats obtenus au cours de cette première surveillance corroborent les résultats obtenus au cours des premières investigations dans les denrées alimentaires (Piérard *et al.*, 1997b). En Hollande, en 1996, la prévalence des STEC a varié entre 0,3 % à 0,5 % dans les viandes hachées mixtes (bœuf et porc); entre 0 et 1,1 % dans la viande hachée de bœuf; entre 0,3 et 1,3 % (viande hachée de porc et autres sous produits) (Heuveulink, 1999b)

Deux *E. coli* de sérotype O128 entéropathogènes (EPEC) et deux souches de sérotype O91 *stx*⁺, *eae*⁻ ont été isolés dans les viandes hachées analysées. Ces sérotypes ont également été impliqués dans des cas sporadiques d'infections à STEC. Certains sérotypes de STEC *stx*₂ *eae*⁻ peuvent devenir potentiellement pathogènes en l'absence du gène *eae* (Brooks *et al.*, 2001, Paton *et al.*, 1999).

En Belgique, les prévalences de STEC O157 enregistrées au cours de ces premières études et le risque d'apparition d'épidémie à STEC/EHEC O157 semblaient très faibles néanmoins la présence d'une souche pathogène isolée à partir de carcasses bovines destinées à la consommation recommandait de continuer la surveillance de ces pathogènes émergents.

1.2.2.2. Prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires d'origine animale

Les résultats obtenus au cours des différents plans de surveillance montrent que les filières de production de viande de porcs, de volailles, de poissons et de lapins ne semblent pas à l'heure actuelle

présenter un risque de contamination par des STEC O157 potentiellement pathogènes. Aucune souche STEC O157 pathogène n'a été isolée à partir de ces matrices.

Au niveau des matrices de porcs, deux souches d'*E. coli* O157 non pathogènes (*stx*-; *eae*-) ont été isolées à partir d'écouvillons de carcasses de porc en 1998 (étude I), 8 autres souches ont été isolées sur 135 échantillons analysés en 1997 et aucune n'a été isolée au cours des programmes de surveillance réalisés en 2000 à partir des matrices de porcs.

Ces données concordent avec celles obtenues dans d'autres études. Tutenel et al (2003) ont isolé une souche d'*E. coli* O157 (1,17 %) non pathogène (*stx*- *eae*-) sur une carcasse de porcs (n=85).

Bouvet et al., (2001) ont détecté la présence du gène *stx* dans respectivement 12,7 % et 50 % des échantillons de viandes et d'écouvillons de carcasses de porcs. Aucun STEC O157 n'a été isolé. Dans une autre étude (Bouvet *et al.*, (2002) ont détecté la présence de STEC dans 15 % (n= 2146) des carcasses de porcs écouvillonnées, mais aucune souche isolée ne possédait la totalité des facteurs de virulence recherchés. De même, Aucun STECO157 n'a été isolé dans les 189 échantillons de viandes hachées de porcs prélevées au niveau de la distribution (Fantelli et al., 2001).

Une étude réalisée au Canada (Desrosiers *et al.*, 2001) n'a détecté aucun STEC O157 dans les matières fécales chez le porc et que les souches STEC isolées chez ce dernier étaient différentes (pathotype, génotype et profil PFGE) de celles isolées chez l'homme. Cependant, une étude menée en Angleterre (Smith et al., 1991) a détecté la présence de sérotypes de STEC (O91:H-, O115:H10 et O128:H2) dans des saucisses de porcs. Ces sérotypes ont été impliqués dans des cas d'infections humaines. En France, la prévalence des STEC O157 chez les porcins est inférieure à 2 % (Andral, 2003). En chine, STECO157 *stx*₂ *stx*₂*vh*_a *eae* a été isolé dans 3,3 % des 30 échantillons de viandes de porcs prélevées au niveau de la distribution (Zhou et al., 2002).

En 2004, la prévalence des STEC O157 isolés à partir d'échantillons de viande de porc prélevés soit au niveau de la transformation soit au niveau de la distribution a été de 0,7 % en Espagne, 0,8 % en Italie, 1,8 % en Irlande. Les STEC non O157 ont été détectés dans 16 % des échantillons de viandes au stade de la transformation au Portugal et 5,4 % au niveau de la distribution (EFSA, 2004)

Les **produits de la pêche** ont été considérés comme une denrée à risque pour les STEC O157 en Belgique dans le cadre d'une étude cas-témoin (Piérard, 1999). Cependant, aucun STEC O157 n'a été isolé dans les matrices de poissons analysées en 1999 (n=131). La présence de STEC (non O157) dans les produits de la pêche a été signalée en 2004 en Espagne et en Italie avec respectivement une prévalence égale à 6,9 % (n= 319) et 3,1 % (n=423) (EFSA, 2004). De même, une prévalence de 3 % a été enregistrée en Inde (Kumar et al., 2001) et des souches STEC produisant *Stx*₂ ou *Stx*₁ et *Stx*₂ ont été mises en évidence dans les fruits de mer (Kumar et al., 2004). Ces dernières étaient toutes positives pour le gène *ehxA* et négatives pour le gène *eae*. STEC O157 a été impliqué dans des cas sporadiques d'infections survenues au Japon à partir de laitance de saumon contaminés (Asai et al., 1999)

Au niveau des matrices de volailles, aucune détection de STEC O157 n'a été enregistrée à partir des matrices analysées en Belgique en 2001 à partir de peau de poulet (n=303), de foies de poulets (n=60), de filets (n=241), de peau de poule (n=212) et peau de dinde (n=60) alors que 6 souches d'*E. coli* O157 *stx*- avaient été isolées de 72 échantillons de volailles en 1997 avec un protocole d'enrichissement peu sélectif. Aucun STEC O157 n'a été détecté sur les surfaces de carcasses (n=71) et dans les prélèvements de muscles du bréchet (n=203) analysés en Belgique (Tutenel, 2003).

Sur la base de ces résultats, La volaille ne constitue pas à l'heure actuelle un risque de contamination pour ces pathogènes car aucune épidémie liée à ces produits n'a été rapportée à ce jour. *E. coli* O157 (*stx*-) a été isolé dans quatre échantillons sur 110 analysés en France (Vernozy-Rozand, 1997). Doyle et Schoeni, 1987, Ils ont montré la présence de STEC O157 dans 1,5 % (4/263) des produits de volailles. En 2004, en Espagne, des prévalences de STEC égale à 1,1 % et 1,7 % ont été enregistrés respectivement au niveau du secteur de la distribution et au niveau des abattoirs de volaille mais aucun STEC O157 n'a été mis en évidence (EFSA, 2004). Une étude américaine a permis de détecter des STEC O157 sur 4 % des carcasses de volailles. (Andrall, 2003) et une étude récente a mis en évidence le portage de STEC O157 dans quatre élevages de poules pondeuses avec 26 prélèvements positifs sur 720 testés (Dipineto et al., 2006).

Aucun STEC n'a été détecté dans les matrices de dinde testées au cours du plan de surveillance de 2001. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus en Irlande (EFSA, 2004).

Au niveau des matrices de bœuf, des souches STEC O157 typiques et atypiques ont été régulièrement isolées dans les matrices d'origine bovine au cours des plans de surveillance en Belgique (1998 à 2004). Ces résultats confirment que ces animaux sont les principaux réservoirs de souches STEC O157 et autres sérotypes de STEC potentiellement pathogènes pour l'homme. La prévalence des STEC O157 est en moyenne égale à 0,95 %. Aucune souche n'a été détectée chez les veaux et aucun STEC O157 n'a été détecté au cours de la première année de la surveillance réalisée en 1997. Ceci était lié, probablement au faible nombre d'échantillons analysés par matrice (n=60), à la méthode de détection utilisant un enrichissement peu sélectif mais aussi à la faible surface par carcasse écouvillonnée (seulement 400 cm²).

Les plans de surveillance réalisés de 1998 à 2004 ont permis grâce à une amélioration de la méthodologie de recherche (nombre d'échantillons plus important, augmentation de la surface écouvillonnée à 1600 cm²; modification de la méthode analytique) d'avoir une meilleure détection et une estimation objective de la prévalence (0,95 %) des STEC O157 sur les carcasses de bœuf.

Les valeurs de prévalence enregistrées entre 1998 et 2004 ont évolué de 0,4 % à 1,4 %. Les prévalences les plus élevées ont été enregistrées en 1999 (1,3 %) et en 2004 (1,4 %) mais aucune

évolution statistique pendant ces années d'études n'a été constatée si ce n'est pour l'année 2000 où on constate une diminution significative de la prévalence au niveau des carcasses. Des prévalences très proches 0,3 % en Suède, 0,69 % au Royaume-Uni ont été rapportées dans les rapports transmis à la Commission Européenne (EC, 1997). Ultérieurement en 2001, des valeurs de STEC O157 égales à 0,7 % au Danemark (EC, 2001) et 0,2 % en Norvège (EC Report, 2002) ont été enregistrées. Les valeurs les plus faibles soit 0,04 % (n=2355) en Norvège (EC, 2001) et les plus élevées : 11 % (Mc Evroy et al., 2003) et 3,0 % (Carney et al., 2006) en Irlande; 12 % en Italie (Bonardi *et al.*, 2001), 10,7 % en France (Rogerie et al., 2001) et 17,8 % aux USA (Elder et al., 2000) ont été signalées. La Pologne a enregistré une prévalence de STEC de 8,3 % des sur des carcasses de bœuf (EFSA, 2004). Des valeurs intermédiaires de STECO157 de 1,4 % au Royaume Uni (Chapman, 2001), 3,6 % en Turquie (Gun et al., 2003) et 3% en Irlande (Carney et al., 2006) ont été enregistrées.

A partir des 751 échantillons de **viandes de découpe** de bœuf analysés entre 1999 et 2004, sept souches STEC O157 typiques ont été isolées soit une prévalence moyenne égale à 0,93 % et à partir des 2.575 échantillons de **viandes hachées** analysées, quatre souches STEC O157 ont été isolées soit une prévalence de 0,15 %. Statistiquement, la différence au niveau prévalence observée entre les carcasses (0,95 %) et les viandes de découpe (0,93 %) n'est pas significative contrairement à celle observée entre la viande hachée (0,15 %) et les autres matrices. Des prévalences égales à 0,18 % en Belgique (Tutenel et al., 2003), 1,1% en Hollande (Heuvelink et al., 1999); 0,11 % en France (Vernozy Rozand et al., 2002).. En général, la prévalence des STEC O157 est inférieure à 1 %. Cependant des valeurs plus élevées 5 % (3/58) en Espagne (Blanco et al, 1996), et 2 % (Stampi et al., 2004) ont été enregistrées en Italie.,

Les prévalences de STEC O157 dans les viandes de découpe sont de 0,4 % au Royaume Uni (Chapman, 2001), 8,82 % en Italie (EFSA, 2004), 2,4 % en Irlande (Carney et al., 2006). Pour les STEC, des valeurs de 2,9 % au stade de la distribution en Allemagne, de 4 % en Espagne et de 38,2 % en Italie ont été enregistrées. Aucune présence de STEC dans ces produits n'a été signalée à Chypre, en Estonie, en Slovaquie en Irlande et en Suède (EFSA, 2004).

Dans d'autres continents, la prévalence des STEC O157 est plus élevée. En Argentine, les STEC O157 ont été retrouvés dans 3,8 % de viande hachée, dans 4,8 % de saucisses fraîches et 3,3 % de salami (Chinen *et al.*, 2001). Une étude américaine a mis en évidence la présence de STEC O157 dans 0,2 % des viandes de découpe (Warren *et al.*, 2002). Cependant toute comparaison ou interprétation reste difficile car L'échantillonnage, le type de produits et les procédures de détection ne sont pas toujours identiques entre les Etats-membres

Même si la prévalence des STEC O157 pathogènes mise en évidence dans les échantillons de viandes hachées et viandes de découpe de bœuf au cours des plans de surveillance en Belgique semble faible,

la présence de souches pathogènes dans du haché de bœuf prélevé en grande surface au stade de la consommation n'exclut pas le risque de contamination voire d'infections humaines, d'autant plus que la dose infectieuse est très faible pour ces germes. En effet, la multiplication de la bactérie n'est pas nécessaire.

Deux épidémies d'EHEC O157 ont été signalées en Belgique: La première en 2001 touchant au moins cinq personnes qui avaient toutes mangé du filet américain mais malheureusement les isolats n'ont pas été sauvegardés ni confirmés (EC, 2001, UZ-Brussel). La deuxième épidémie a incriminé en 2004, un STEC O157:H7 isolé à partir des selles d'une femme âgée de 64 ans, souffrant du syndrome hémolytique urémique (SHU), qui résidait dans une institution psychiatrique où une épidémie de diarrhée sanguinolente avait eu lieu suivie par 3 autres cas de SHU. Une recherche tardive a seulement démontré la présence d'un porteur de longue durée de STEC O157:H7 parmi le personnel de cuisine (EFSA, 2004, UZ-Brussel).

1.2.3. Caractérisation des souches STEC O157 isolées en Belgique

Entre 1998 et 2004, 106 souches STEC/ EHEC de sérotype O157 ont été isolées en Belgique dans les denrées alimentaires. La majorité des souches (n=75) présente le pathotype *stx₂, eae, ehxA*. Vingt et une (n=21) souches STEC O157 expriment *stx₁, stx₂, eae et ehxA*. Aucune souche *E. coli* de sérotype O157 n'est *stx₁ eae ehxA* et 81,1 % expriment l'antigène H7. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus dans d'autres études, notamment en France (Rogerie *et al.*, 2001). Les souches les plus virulentes produisent en majorité la toxine Stx₂ ou les deux toxines: Stx₂ et Stx₁ (Eklund *et al.*, 2002).

Les STEC appartenant au sérotype O157:H7 ou H-, possédant les gènes *stx₂ eae* sont les plus fréquemment responsables de l'évolution de l'infection vers le syndrome hémolytique urémique (Meng *et Doyle*, 1997). Les facteurs qui expliquent l'hétérogénéité de la virulence entre les sérotypes de STEC et des souches appartenant à un même sérotype ne sont pas complètement élucidés.

Le dépistage des STEC en milieu hospitalier, en Belgique, a permis de mettre en évidence deux types de STEC: celles qui sont typiques possédant les facteurs de virulence qui caractérisent les EHEC et celles qui sont atypiques qui manquent d'un ou de facteurs accessoires (soit *eae* soit *ehxA*).

Entre 1994 et 2004, 358 EHEC typiques ont été isolés dans les selles de patients en Belgique. Le sérotype O157 est le plus fréquemment isolé (n=241). Viennent ensuite les sérotypes O26 (n=33); O103 (n=20) et O111 (n=19). La majorité des STEC O157 produit Stx₂ ou Stx₁ et Stx₂ tandis que les autres sérotypes produisent en majorité Stx₁. Le plus grand nombre de souches STEC typiques isolées a été observé en 1999 (46 STEC dont 34 O157) mais aucune évolution significative de 1996 à 2004 n'a été constatée sur base des données du laboratoire national de référence humain (Dr Piérard, UZ-Brussel)).

1.2.4. Pertinence de la mise en place de critères microbiologiques (*E.coli* et STEC O157)

L'ICSMVSP a donné un avis sur les STEC dans les denrées alimentaires. Dans cet avis, le comité est parvenu à la conclusion que l'application d'une norme microbiologique pour STEC O157 dans le produit final n'entraînerait pas de réductions sensibles du risque pour les consommateurs. Néanmoins, des orientations microbiologiques destinées à réduire la contamination fécale dans la chaîne alimentaire peuvent contribuer à réduire les risques pour la santé publique, y compris les risques liés aux STEC. Cet avis insiste sur l'intérêt du respect des bonnes pratiques d'hygiène et de la mise en place du système HACCP tout au long de la chaîne alimentaire pour réduire le risque de transmission de ce germe pathogène au consommateur. Il précise que toute action doit déboucher sur la mise en place de mesures appropriées et que la mise en place d'analyses peut apporter une certaine efficacité lorsque l'on tente de réduire la contamination fécale et les contaminations croisées ultérieures. La mise en place de critères indicateurs d'hygiène associés à la mise en œuvre d'actions correctives concernant la contamination de surface est une des recommandations de l'USDA, de la décision européenne 2001/471/CEE et de l'arrêté royal du 28 août 2002 au niveau belge.

En 1996, L'USDA a recommandé un schéma de contrôle basé sur la contamination superficielle des carcasses par *E. coli* pour évaluer le niveau hygiénique des différentes filières de production. *Escherichia coli* est considéré comme l'indicateur de contamination d'origine fécale de référence. L'approche adoptée aux USA par the «Food Safety and Inspection Service, FSIS» consiste à établir une base de données pour établir les critères microbiologiques selon un plan à trois classes ou (m) représente la limite inférieure de la zone marginale (négative pour les bovins, égale à 10 ufc/cm² chez le porc); M représente la limite supérieure de la zone marginale (100 ufc/cm² chez le bovin et 10.000 ufc/cm² chez le porc). Le nombre d'échantillons testés pour l'interprétation des résultats doit être égal à 13 et le nombre maximal permis dans la zone marginale est égal à 3.

Au niveau européen, l'approche est différente. Chaque pays doit établir ses propres critères et effectuer les mesures par rapport aux critères qu'il aura pré-déterminés. L'arrêté royal du 28 août 2002, transposant la décision 2001/471/CE (Anonyme, 2001) du 8 juin 2001 a choisi le dénombrement d'*E. coli* comme l'USDA car il permet d'investiguer spécifiquement la contamination fécale, principal risque au stade de l'abattoir. Les résultats doivent être affectés à l'une des catégories : satisfaisant, acceptable et inacceptable. « 3m » est égal à $7,0 \cdot 10^{-1}$ ufc/cm² et « M » à 20 ufc/cm² pour les carcasses de bovins par la méthode d'écouvillonnage. Le nombre d'unités composant l'échantillon est égal à 15 et la tolérance c entre « 3m » et « M » est égale à 3. Ces critères ont été établis à partir des résultats des plans de surveillance rapportés dans ce travail. C'est une première en Belgique, voire en Europe, d'avoir des critères déduits de la situation nationale afin de l'améliorer.

Un résultat individuel inacceptable (au delà de « M ») ou plus de trois résultats acceptables (entre «3m» et « M ») sur les 15 derniers résultats doivent déclencher une action en vue de réexaminer les contrôles de processus, en déceler, si possible, la cause et en empêcher la répétition. Chaque exploitant doit viser à améliorer constamment ses résultats.

Au cours des plans de surveillance menées en Belgique, de 1998 à 2004, on a pu observer une amélioration du niveau de contamination par *E. coli* dans les entreprises productrices de carcasses de bœuf. Durant les premières années des plans de surveillance (1998 et 1999), le niveau d'hygiène de la majorité des entreprises ayant révélé la présence d'au moins un STEC O157 avait été jugé non acceptable. L'appréciation non acceptable «NA» est attribuée aux entreprises ayant enregistré plus de 20 % des résultats dans la zone située entre «3m» (0,7 ufc/cm²) et « M » (20 ufc/cm²) ou au moins un résultat au-delà de « M ».

En 2002, les carcasses ayant révélé la présence d'un STEC O157 étaient en majorité de qualité satisfaisante. L'appréciation « Satisfaisante » correspond à une firme n'ayant obtenu aucun résultat supérieur à « 3m » (< 0,7 ufc/cm²). Cependant, aucune corrélation directe entre le nombre d'*E coli* B-glucuronidase et la présence des STEC O157 au niveau des carcasses n'a été établie. En d'autres termes, le taux de contamination par les STEC O157 ne semble pas diminuer entre 1998 et 2004 mais le niveau de ce pathogène dans les échantillons s'est probablement amenuisé. La preuve de ce phénomène n'a pu être apportée par manque de données quantitatives pour les STEC O157.

De même, en ce qui concerne la production des viandes hachées, Une amélioration des critères de performance au niveau de la production des viandes hachées a été observée. Cependant, deux viandes hachées positives pour lesquelles la présence de STEC O157 (*stx*₂₊) a été mise en évidence, avaient un niveau de contamination en *E. coli* au delà de la limite supérieure (> 500 ufc) mais la concentration réelle en STEC O157 n'a pu être déterminée.

1.2.5. Procédure d'alerte en cas de détection d'un STEC O157

Lorsque la présence d'un STEC O157 est constatée, la ferme d'origine est identifiée grâce au système de traçabilité «SANITEL». Le dépistage des STEC O157 est réalisé à partir des matières fécales de 20 % des animaux choisis entre 6 mois et deux ans, au niveau des aliments, de l'eau, et de l'environnement. Les animaux sur pied, ainsi que le lait et produits dérivés non traités sont interdits à la vente.

En 2003, suite à la détection des STEC O157 sur les carcasses de bovins, des enquêtes ont été menées au niveau de quatre troupeaux d'origine. La présence de STEC O157 (*stx2*, *eae*) a été détectée dans trois d'entre eux et des *E. coli* O157 (*stx*-) dans le quatrième troupeau (Rapport EC, 2003).

En 2004, la même procédure a été adoptée: des STEC O157 typiques (*stx2*, *eae*) ont été trouvés dans deux troupeaux sur les 11 testés. Les animaux dont les matières fécales avaient révélé leur présence ont été isolés et soumis à un deuxième test après six semaines. Les STEC O157 n'ont été détectés que dans un seul troupeau (CE, 2004). L'infection des cheptels à STEC O157 ainsi que le portage sain est transitoire d'où la nécessité d'examiner de nombreux animaux sur une période assez longue. Le portage sain peut être inférieur à 3 mois mais à l'échelle du troupeau peut durer plusieurs années (Zhao, 1995).

Une étude récente en Belgique (Cobbaut, 2006) a montré la présence des STEC O157 dans six troupeaux sur 12 examinés et une prévalence de 19,7 % des animaux. Après renouvellement des tests de détection, ces germes n'ont été retrouvés que dans quatre troupeaux. Des différences au niveau de l'excrétion ont été enregistrées entre les animaux d'un même troupeau variant entre 10^{-2} et 10^6 ufc/g pendant plusieurs mois. Dans cette étude, 73 % des souches d'*E. coli* O157 isolées possèdent le gène *stx2*, 4,9 % : *stx1* et *stx2* et 22 % sont *stx*-. C'est en agrément avec les résultats des plans de surveillance des présentes études qui ont montré une prédominance de souches EHEC O157 *stx2* isolées sur les surfaces de carcasses de bœuf.

2. Prévalence des STEC en Algérie

Au niveau algérien aucun plan de surveillance n'existe en ce qui concerne les agents zoonotiques dont font partie les STEC O157. Cette étude se positionne comme une étude pilote afin de faire un état des lieux dans le but éventuellement d'alerter les autorités compétentes en vue de l'établissement de tels plans. De plus, au niveau humain, il n'existe pas non plus de statistiques des cas cliniques liées aux STEC O157 comme les diarrhées hémorragiques ou les syndromes hémolytiques urémiques. On voit donc que les situations belge et algérienne sont assez différentes. Néanmoins, il est important d'initier un processus d'amélioration de la qualité des denrées alimentaires. C'est tout le mérite de cette étude même si elle est limitée.

Au niveau de la sélection des denrées alimentaires en fonction des pratiques de consommation de la population algérienne, notre attention s'est portée sur les bovins et les ovins.

2.1. Chez les bovins

2.1.1. L'hygiène

En réalisant des dénombrements d'*E. coli* sur les carcasses bovines, nous avons pu évaluer le niveau d'hygiène au niveau de l'abattoir principal de la ville d'Alger. Les résultats montrent que les carcasses bovines produites dans cet abattoir sont hautement contaminées. La limite inférieure correspondant au percentile 75 est égale à 440 ufc/cm², nettement plus élevée que les limites supérieures d'acceptabilité définies par les législations belge (20 ufc/cm²) et américaine (100 ufc/cm²). Moins de 5 % des carcasses avaient un niveau d'hygiène satisfaisant et plus de 65 % des carcasses avaient des valeurs d'*E. coli* supérieures à la limite d'acceptabilité si on leur applique les critères microbiologiques belges (20 ufc/cm²). Plus précisément, 70 % des échantillons sont classés dans la zone inacceptable, 25 % dans la zone acceptable et seulement 5 % dans la zone satisfaisante (figure IV.2).

L'application des limites définies par la législation américaine permet de situer 10 % des échantillons dans la zone satisfaisante, 45 % dans la zone acceptable et 45 % dans la zone inacceptable. A ce stade, une première conclusion s'impose, l'hygiène de cet abattoir doit être améliorée et un plan HACCP drastique doit être mis en place. Une deuxième remarque est de se dire que de tels taux de contaminations fécales laissent supposer que si certains animaux sont porteurs de STEC O157, le nombre de carcasses contaminées devrait être important et le niveau de STEC O157 élevé.

2.1.2. Les STEC

Au niveau des 230 carcasses échantillonnées, 18 se sont révélées positives pour les STEC O157 soit une prévalence de 7,8 %. Cette valeur est significativement supérieure aux prévalences observées en Belgique (0, 95%) lors des plans de surveillance. Cependant, on trouve dans la littérature des prévalences du même ordre de grandeur voire supérieures soit 17,1 % aux USA (Elder et al, 2000); 12 % en Italie (Bonardi et al, 2001), 11 % en Irlande (McEvroy et al, 2003). Il faut aussi noter que comparer des prévalences est dangereux dans la mesure où les méthodes de prélèvement et d'analyses sont différentes d'une étude à l'autre.

En ce qui concerne l'analyse de la prévalence des STEC O157 en Algérie, il serait intéressant de compléter cette étude en amont par une étude sur la prévalence au niveau des matières fécales chez les bovins dans les fermes et en aval par une étude au niveau de la prévalence des STEC O157 au niveau humain notamment dans les services pédiatriques des hôpitaux.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, il nous a été donné d'isoler par coproculture la première souche STEC O157 chez un enfant âgé de 13 mois souffrant de diarrhées hémorragiques (résultats non montrés). Les *Escherichia coli* entéropathogènes sont plus fréquemment associés aux cas de gastroentérites infantiles dans les pays en voie de développement. De même, suite aux enquêtes menées en milieu hospitalier, il nous été permis de rapporter les 50 cas de SHU chez des enfants âgés de 0 à 10 ans durant la période comprise entre 1975 à 2002 dans un hôpital (service de néphrologie, hôpital Mohamed Nadir de Tizi Ouzou)

En ce qui concerne les STEC ou les AEEC non O157, 13 % des carcasses se sont montrées positives. Parmi les souches isolées, la plupart étaient de type EPEC et pouvaient par conséquent engendrer des diarrhées chez l'homme. Trois souches étaient des STEC présentant une panoplie complète de gènes de virulence. Le danger pour la santé publique est donc bien réel. Enfin, la méthode d'analyse utilisée ne donnait un résultat positif que si au moins 10 % des *E. coli* étaient des AEEC. Par conséquent on peut concevoir que la prévalence estimée est inférieure à la prévalence réelle. La prévalence des souches AEEC au niveau des bovins en ferme est aussi une chose à investiguer dans l'avenir.

Il faut néanmoins rappeler que les STEC O157 seront détruits par la cuisson de la viande conformément aux traditions locales. Cependant, il ne faut pas négliger les contaminations croisées à partir des viandes crues.

2.2 Chez les ovins.

Bien que le réservoir principal des STEC soit le bovin, les ovins peuvent aussi être porteurs de ces souches (Beutin et al., 1993, Kudva et al., 1997, Caprioli et al., 2005). De plus, l'Algérie est une grande productrice et consommatrice de viande ovine avec 1,3 millions d'ovins élevés chaque année (données direction des services vétérinaires d'Alger). Il nous semblait donc important d'étudier la prévalence des STEC chez les ovins. Pour ce faire, deux types d'échantillons ont été analysés, d'une part des carcasses d'ovins à l'abattoir et d'autre part des matières fécales.

Les ovins sont porteurs de STEC capables de produire Stx1, Stx2 et/ou leurs variants, l'entérohémolysine, les lésions d'attachement effacement et autres facteurs de virulence.

Ils hébergent un certain nombre de sérotypes dont les plus fréquents (O5:H-, O91:H-, O128:H2, O146:H8 et O146:H21) ont été impliqués dans des cas d'infections humaines, des cas de SHU et d'épidémies (cas du sérotype O91:H-) (Vettorato, 2003). Ils représentent dans les régions d'élevages, un facteur de risque à ne pas négliger et une source de danger potentiel pour l'homme.

La prévalence des STEC O157 sur les carcasses ovines est égale à 2,5 % dans cette étude (étude V). Sur les cinq souches STECO157 isolées, 4 possédaient le pathotype *eae*, *stx*₂ et *ehxA*, une souche, le

pathotype *eae*, *stx₁* et *ehxA*. Très peu de données concernant la prévalence des STEC O157 sur les carcasses ovines sont disponibles. Une première étude a révélé leur présence sur 0,7 % de carcasses testées (Chapman et al, 2001) et sur 0,3% des carcasses écouvillonnées (Philips et al., 2006).

En ce qui concerne les pathotypes de STEC O157 isolés, les données sont en agrément avec une autre étude (Novotna et al, 2005) qui montre la présence des gènes *stx₂* *ehlyA*, *eae* dans toutes les souches STECO157 isolés et la présence des gènes *stx₁* et *ehlyA* dans les STEC non O157

Au niveau des matières fécales 26,4 % des échantillons présentaient des souches STEC ce qui est comparable aux valeurs de 29,9 % obtenues en Suisse (Zweifel et al., 2004) et inférieur aux 35 % trouvés en Espagne (Rey et al., 2003), aux 45 % en Australie (Fegan, 1999), aux 52,1% trouvés au Brésil (Vettorato, 2003) et aux 66,8 % en Serbie (Cobeljic, 2005). Ces résultats confirment que l'ovin est un réservoir important des STEC potentiellement pathogènes au niveau des matières fécales et pourrait être une source de contamination importante pour l'homme particulièrement en Algérie où la viande ovine est consommée en grande quantité.

3. Perspectives

Au niveau belge, les plans de surveillance doivent être maintenus surtout au niveau des matrices bovines: carcasses, viandes hachées, découpes. Ces études devraient être couplées en amont avec des études de prévalence au niveau des exploitations agricoles et en aval avec les données en pathologie humaine. Une plus grande coordination devrait s'opérer entre le secteur vétérinaire et la santé publique. Par chance, en Belgique, le laboratoire de référence pour les EHEC est le même dans les deux cas (UZ-Brussel) ce qui signifie que les méthodes de typage appliquées aux souches des deux origines sont les mêmes. Il serait cependant utile que le SHU soit à déclaration obligatoire comme c'est le cas en France.

Les nouveaux critères microbiologiques européens (règlement (CE) N°2073/2005) vont obliger chaque industriel à prouver qu'il est en mesure de maîtriser correctement la qualité de ses produits. Ceci ne devrait qu'accroître la sécurité à travers la qualité microbiologique des aliments dans toutes les filières. Cependant, en ce qui concerne la surveillance des STEC, le seul sérotype recherché de manière systématique est le sérotype O157. Le développement de méthodes efficaces pour d'autres sérotypes notamment les sérotype O26 devrait permettre d'étendre les plans de surveillance à ces autres sérotypes potentiellement dangereux pour l'homme.

Au niveau algérien, des études complémentaires tant au niveau vétérinaire qu'au niveau humain doivent être menées pour avoir une idée correcte de la situation concernant les STEC. Ces données devraient permettre de convaincre les autorités compétentes de l'importance de réviser d'une

surveillance continue et de l'application de plans HACCP au niveau des entreprises agro-alimentaires pour améliorer la qualité microbiologique des produits et donc protéger la santé publique.

Plus globalement on peut dire que, grâce aux méthodes performantes de détection des STEC O157, ce travail a pu montrer que, même en améliorant l'hygiène de la filière viande comme cela a été le cas en Belgique ces dernières années, le risque exprimé en termes de taux de contamination reste sensiblement le même.

Etant donné la faible dose infectieuse de ce germe, il faut donc prendre des mesures supplémentaires telles que i) interdire la consommation de viandes crues aux populations à risque ; ii) développer un système spécifique de production des viandes destinées à être consommées crues comme suggéré dans le Règlement (CE) N°2073/2005/CE ; iii) trouver un moyen pour réduire le portage et surtout l'excrétion des STEC O157 par les animaux ou, peut-être, iv) mettre en place une vaccination prophylactique de l'homme contre l'affection liée aux STEC. Pour y arriver, de nombreuses recherches sont encore nécessaires.