

**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

**Etude III. Surveillance du taux de contamination des denrées alimentaires d'origine animale par des souches d'*Escherichia coli* du sérotype O157 en Belgique de 1997 à 2004**

Survey of the contamination of food stuffs of animal origin by Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003.

CHAHED A., GHAFIR Y., CHINA B., DIERICK K., DE ZUTTER L., PIERARD D., DAUBE G.

Eurosurveillance (2005) 10, 9-10.

## A. Préambule

Cette étude s'intéresse à la prévalence des *E. coli* de sérotype O157 producteurs de shigatoxines dans les denrées alimentaires d'origine animale, dans le cadre des plans de surveillance en application des directives 92/117/CEE (Anonyme, 1992) et 2003/99/CE (CE, 2003). Chaque Etat-membre était chargé de collecter des données pertinentes concernant les principaux agents zoonotiques et d'en faire un rapport au comité vétérinaire permanent et à la commission européenne. C'est dans ce cadre que l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV) en Belgique a mis en place dès 1997, un programme de surveillance de ces agents pathogènes en collaboration avec trois laboratoires : Le laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (ULg); Vakgroep Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren, Diergeneeskunde Faculteit, Universiteit Gent (UGent); le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Institut Scientifique de la Santé Publique : Louis Pasteur (ISP-LP). Deux laboratoires de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) ont participé aux analyses à partir de 2003.

Ce document décrit la méthode d'études des STEC O157, les priorités de surveillance qui ont été fixées pour chaque année (de 1997 à 2004) ainsi que les résultats de prévalence et leur évolution. Parallèlement à la recherche des STEC de sérotype O157, une évaluation du niveau de contamination par un indicateur de contamination fécale, *Escherichia coli*, devait permettre d'apprécier le niveau d'hygiène des différentes filières de production belge.

L'objectif était d'évaluer la contamination des denrées alimentaires et de déterminer l'importance du problème des STEC de sérotype O157 dans le but de pouvoir fixer des priorités quant aux mesures préventives ou correctives à mettre en place en Belgique.

Afin de faciliter la lecture, les études ont été scindées en 3 parties : Les analyses effectuées en 1997; puis celles réalisées en 1998 et, enfin, celles de la période 1999-2004.

## **B. Plan de surveillance de l'année 1997**

### **I. Justification de l'étude**

La Belgique a mis en place en 1997, la première démarche de surveillance des agents pathogènes dans les denrées alimentaires. Le rapport intitulé « trends and sources of zoonotic in the EU, 1995 » a insisté sur l'importance d'accroître la surveillance de quatre agents pathogènes *Salmonella spp*, *Yersinia Enterocolitica*, *Campylobacter spp* et *E. coli* entérohémorragiques de sérotype O157.

Contrairement à d'autres pays, en Belgique le taux de prévalence de ces agents n'était pas connu. A cette date, aucun plan de surveillance aléatoire global concernant les denrées alimentaires n'avait été mis en place dans le pays.

Cette étude est la première réalisée dans ce contexte. Elle a commencé au mois d'Avril 1997 jusqu'au mois de décembre de la même année. Elle a été le point de départ d'une surveillance de grande ampleur qui a continué pendant les années qui ont suivi.

Seulement les résultats concernant le dénombrement des *E. coli* et la recherche des STEC O157 seront présentés ici.

### **II. Plans d'échantillonnage et méthodologie de recherche**

#### **1. Choix des matrices**

Les matrices ont été choisies dans le cadre de cette étude en fonction de plusieurs critères importants :

1. En conformité avec les matrices mentionnées dans les formulaires communiqués par le laboratoire communautaire de référence de Berlin pour la collecte des résultats obtenus dans les Etats-membres en application de la directive 92/117/CEE (Anonyme, 1992).
2. En fonction des matrices étudiées dans d'autres études et qui permettront une comparaison pertinente des données obtenues.
3. En fonction des données de prévalences disponibles par ailleurs dans la littérature scientifique.
4. En fonction des types de denrées produites en Belgique (conformément aux habitudes alimentaires).

Les matrices choisies ont permis d'avoir une vue d'ensemble du secteur de production des denrées alimentaires d'origine animale et d'évaluer les risques aux principales étapes de production et/ou de transformation.

## 2. Matrices investiguées

### 2.1. Bovins et porcins

A la sortie des abattoirs, la contamination de surface des foies et des carcasses de gros bovins, de veaux et de porcs charcutiers a été évaluée par écouvillonnage.

A la sortie des ateliers de découpe et de préparation, des échantillons de morceaux de découpe de gros bovins et de porc ainsi que des viandes hachées de bœuf, à base de porc et de veau ont été prélevés.

### 2.2. Volailles et lapins

A la sortie des abattoirs des carcasses de poulets et des carcasses de poules ont été prélevées, ainsi que de la peau de dindes et des foies de poulet. Les carcasses de lapins ont été évaluées par écouvillonnage de surface.

A la sortie des ateliers de découpe, des filets de poulet sans peau, sans os ont aussi été prélevés.

## 3. Nombre d'entreprises échantillonnées :

Matrices	Nombre d'entreprises
Carcasses de bovins	7
Carcasses de porcs	13
Foies de porcs	9
Viandes de découpe de porc	3
Viandes hachées de porcs	4
Carcasses de poulets	7
Foies de poulets	8
Filets de poulets	8
Carcasses de poules	5
Peau de dindes	1

**Tableau n° III.1 : Nombre d'entreprises échantillonnées par type de matrices**

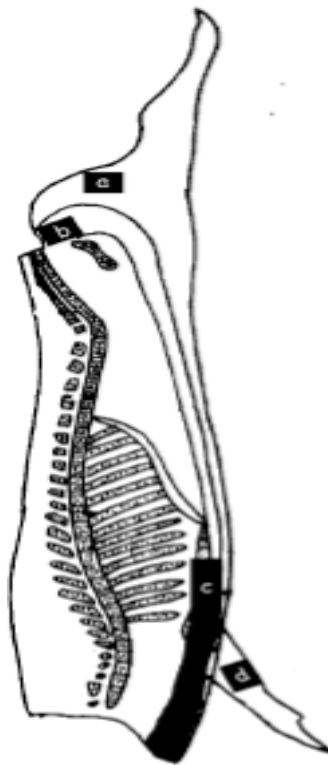
Les plus grosses entreprises belges ont été échantillonnées proportionnellement à leur volume de production (tableau III.1)

#### 4. Méthodologie d'échantillonnage

##### 4.1. Ecouvillonnages

Les écouvillonnages ont été réalisés sur les carcasses de porcs, de bœuf, de veaux et de lapins. Ils ont été effectués à l'aide d'une pince stérile et de cotons cosmétiques stérilisés. La technique du double écouvillonnage a été utilisée à savoir un premier passage sur les zones à écouvillonner avec un coton imbibé d'une solution stérile de tryptone sel (tryptone:1g, chlorure de Na: 8,5g) et un second passage sur les mêmes zones avec un coton sec. Les cotons ont été regroupés dans un même sac stomacher stérile.

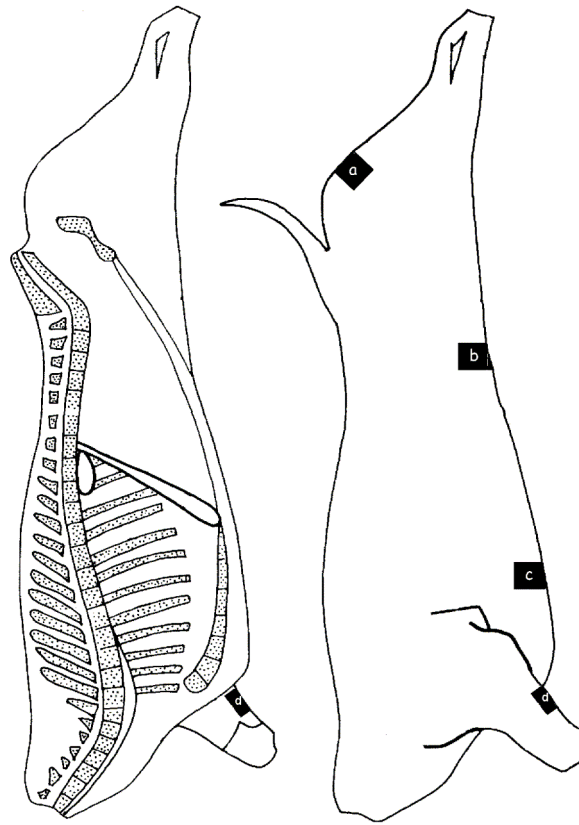
Carcasses de porcs : une zone de 600cm<sup>2</sup> a été écouvillonnée au niveau des sites présentés sur la figure III.1.



- (a) Face interne musculaire du jambon (100 cm<sup>2</sup>)
- (b) Partie postérieure de l'intérieur du bassin (100 cm<sup>2</sup>)
- (c) Sternum et muscles sterno céphaliques (300 cm<sup>2</sup>)
- (d) Face postérieure du membre antérieur (100 cm<sup>2</sup>)

**Figure III.1. Zones écouvillonnées sur les carcasses de porcs**

Carcasses de veaux et gros bovins : une zone de 400 cm<sup>2</sup> a été écouvillonnée au niveau des sites présentés sur la figure III.2.



- (1) Zone postéro-externe de la cuisse (100 cm<sup>2</sup>)
- (2) Flanc (100 cm<sup>2</sup>)
- (3) Thorax (100 cm<sup>2</sup>)
- (4) Face postérieure du membre antérieur (100 cm<sup>2</sup>)

**Figure III.2. Zones écouvillonnées sur les carcasses de bovins**

Carcasses de lapin : l'ensemble de la carcasse a été écouvillonnée en 3 zones, à savoir l'intérieur du bassin et les faces interne et externe.

Écouvillonnages des foies :

La moitié de la face postérieure des foies de gros bovins et la totalité de la face postérieure des foies de veau et de porcs ont été écouvillonnées.

## 4.2. Prélèvements

Les viandes, les carcasses ou les écouillons ont été prélevés et conditionnés dans des sacs stériles pour envoi aux laboratoires.

Tous les échantillons ont été prélevés par des experts désignés par l'IEV (Institut d'Expertise Vétérinaire). Les viandes ou les carcasses ont été conditionnées dans des sacs stériles et transportées sous couverture froide au laboratoire pour analyses.

## 5. Nombre d'échantillons testés pour la recherche des *E. coli* O157

Un total de 1025 échantillons a été soumis à la recherche des STEC O157 dans les laboratoires selon la répartition présentée dans le tableau III.2.

<i>Matrices</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>
<b><i>Gros bovins</i></b>	
<i>Carcasses</i>	60
<i>Foies</i>	60
<i>Découpes</i>	60
<i>Viandes hachées</i>	67
<b><i>Veaux</i></b>	
<i>Carcasses</i>	59
<i>Foies</i>	60
<i>Viande hachée</i>	58
<b><i>Porcs</i></b>	
<i>Carcasses</i>	80
<i>Foies</i>	60
<i>Découpes</i>	39
<i>Viande hachée</i>	60
<b><i>Poulets</i></b>	
<i>Carcasses</i>	62
<i>Foies</i>	60
<i>Découpe</i>	60
<b><i>Poules</i></b>	
<i>Carcasses</i>	60
<b><i>Dindes</i></b>	
<i>Carcasses</i>	60
<b><i>Lapins</i></b>	
<i>Carcasses</i>	60
<b><i>Total</i></b>	<b>1025</b>

Tableau III.2. Nombre d'échantillons testés par matrice



### 6. Recherche des STEC de sérotype O157 (figure III.3)

La méthode de recherche des STEC O157 a consisté en une étape de pré-enrichissement des écouvillons ou de 25 g d'échantillons dans 100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) incubés à 37°C pendant 7 heures sous agitation (100 rpm). Une étape de concentration immuno-magnétique (Dynabeads O157, Invitrogen, Merelbeke) a été réalisée à partir de 1 ml du bouillon de préenrichissement. Cent microlitres du concentrat dont cinquante (billes + bactéries) sont étalés sur gélose Mac Conkey au sorbitol (SMAC) et sont incubés à 42°C pendant 18 heures et 50 microlitres dans le milieu m-EC + novobiocine ou mTSB + acriflavine incubés à 37°C pendant 18 heures. Une étape d'immuno-essai (méthode VIDAS ou EHEC-TEK) est réalisée à partir de 100 microlitres du milieu mEC+ novobiocine ou mTSB + acriflavine après incubation à 37°C pendant 18 heures. Lors de réaction positive au test immunoenzymatique, l'isolement et la confirmation des souches ont été réalisés par agglutination au latex anti O157 (Dry-spot *E. coli* O157, Oxoid) des colonies isolées à partir de la gélose SMAC et par une caractérisation biochimique avec les galeries API 20 E (BioMérieux). Les gènes des facteurs de virulence sont recherchés au LNR de l'UZ-Brussel

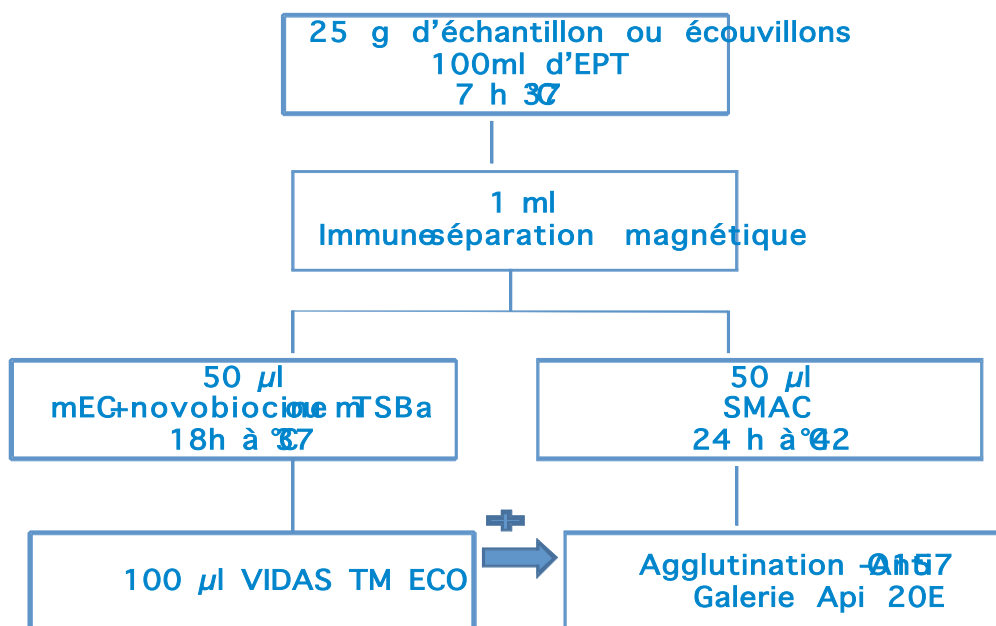


Figure III.3. Schéma pour l'isolement des STECO157

### III. Résultats

Aucune souche de STEC O157 typique n'a été isolée au cours de cette surveillance à partir des matrices testées. Cependant, avec le protocole utilisé, l'antigène O157 a été détecté par réaction immuno-enzymatique (méthode VIDAS) dans les matrices de bovins, porcs, volailles, et lapins (tableau III.3) et de nombreuses souches d'*E. coli* O157 non pathogènes ont pu être mises en évidence après agglutination au latex O157 (Dry-spot *E. coli* O157, Oxoid), caractérisation biochimique avec les galeries API 20 E (BioMérieux) et recherche des gènes de virulence au LNR de l'UZ-Brussel.

Analyses réalisées à l'ULg				
	Bovins	Porcs	Volaille	Lapins
<b>Nombre</b>	140	135	72	20
<b>VIDAS</b>	3 (2, 1 %)	10 (7, 4 %)	16 (22, 2 %)	2 (10 %)
<b><i>E. coli</i> O157 sorbitol+</b>	-	8	6	1
<b><i>C. freundii</i></b>	2	-	2	1
<b><i>Salmonella</i></b>	-	1	-	-
<b>Non isolée</b>	1	1	8	-

**Tableau III.3 : Nombre d'échantillons VIDAS ECO positifs et identification des souches portant l'antigène O157 pour les échantillons analysés à l'ULg.**

### IV. Conclusions

Aucune souche caractéristique de STEC O157 n'a été isolée au cours de cette étude. Il est probable que le faible nombre d'échantillons analysés par matrice n'a pas permis d'isoler des souches d'*E. coli* O157 pathogènes. Cependant, suite à la mise en évidence de nombreux résultats faux positifs, le laboratoire de référence de l'ULg a suggéré la modification de la méthode analytique. Un protocole plus sélectif devait permettre de diminuer ce nombre. Cette première étape a été le point de départ des plans qui ont suivi. Un plus grand nombre d'échantillons composés des matrices les plus probablement contaminées, à savoir un renforcement de la surveillance des STEC O157 au niveau de la filière bovine, a été préconisé pour les études qui ont suivi.

## **C : Plan de surveillance : année 1998**

### **I. Justification de la surveillance**

L'étude réalisée en 1997 a permis d'évaluer la méthode d'étude de la prévalence d'*E. coli* O157 dans les différentes filières de viande fraîche en Belgique. Malgré le faible nombre d'échantillons prélevés pour chaque matrice, une évaluation de la méthode de détection des *E. coli* O157 ainsi que les données collectées ont permis à l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV) de situer les produits belges dans le contexte international. Ainsi, à partir de cette année-là, des priorités de surveillance pour les années qui ont suivi avaient été fixées par l'IEV. En ce qui concerne la surveillance des STEC O157, les priorités retenues ont été les suivantes :

1. Renforcer la surveillance des STEC O157 chez les gros bovins pour connaître l'exacte prévalence de ce pathogène en Belgique. En effet, la consommation de viande de bœuf crue ou peu cuite, expose les populations à risque, les enfants et les vieillards, à un danger direct lors de la consommation de viande même faiblement contaminée. Il était important de connaître l'étendue de ce risque et pouvoir encore le diminuer éventuellement avec l'aide du Ministère de l'Agriculture au stade de l'élevage.
2. Les échantillons prélevés aléatoirement dans tout le pays devaient permettre d'évaluer le niveau d'hygiène des différentes viandes testées. Dans ce but, tous les échantillons prélevés ont été soumis en plus, au dénombrement d'*E. coli*, considéré comme l'indicateur de contamination d'origine fécale notamment pour le contrôle de la contamination superficielle des carcasses.

### **II. Plan d'échantillonnage et méthodologie de recherche**

Le plan d'échantillonnage a été établi en concertation avec les cellules concernées de l'IEV.

#### **1. Matrices investiguées**

Les matrices pour la recherche des STEC O157 ont été choisies en fonction des remarques émises ci-dessus. Les carcasses de gros bovins écouvillonnées en surface à la sortie de l'abattoir étaient les plus indiquées pour la détection de ces germes.

La recherche des STEC O157 a été réalisée sur les échantillons bovins dont 6.000 carcasses écouvillonnées à raison de 400 cm<sup>2</sup> par carcasse (figure III.2) représentant environ 1 % des gros bovins abattus en Belgique. Pour une question de sensibilité de la méthode et de faisabilité et compte tenu du

grand nombre d'échantillons, les prélèvements indépendants de 5 carcasses (8 cotons x 5) ont été rassemblés dans un même sac stomacher pour réaliser une seule analyse.

En cas de résultat positif, une enquête devait être menée simultanément pour les 5 carcasses vers les fermes d'origine grâce aux numéros individuels de traçabilité (*Sanitel*) enregistrés lors du prélèvement.

## 2. Réalisation de l'échantillonnage

### 2.1. Période de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés de juin 1998 à février 1999 pour les carcasses de bœuf du fait du nombre important de prélèvements (6.000 carcasses). Les échantillons ont été prélevés par des vétérinaires experts désignés par l'IEV.

### 2.2. Répartition par laboratoire

Les analyses ont toutes été réalisées pendant la période prévue dans les trois laboratoires définis précédemment. La caractérisation des facteurs de virulence des souches isolées a été effectuée par le laboratoire de référence de l'UZ-Brussel.

## 3. Nombre d'entreprises échantillonnées en 1998

Le nombre d'entreprises concernées a augmenté (40 entreprises) par rapport au nombre d'entreprises ciblées en 1997 ( $n = 7$ ) soit 5,7 fois plus pour l'année 1998.

## 4. Types et méthodologie d'échantillonnage

### 4.1. Ecouvillonnages

La technique du double écouvillonnage a été utilisée comme décrite au cours de la première étude sur une zone de 400 cm<sup>2</sup> (100 cm<sup>2</sup> par zone) par carcasse de bœuf (fig.3.2). Les écouvillons de 5 carcasses ont été regroupés dans un même sac stomacher constituant un échantillon.

#### 4.2. Transport des échantillons

Les prélèvements ont été acheminés sous couverture froide aux laboratoires par les équipes de préleveurs le jour de leur prélèvement ou dans les 24 heures de celui-ci.

Après réception au laboratoire, les échantillons ont été stockés entre 0° C et 4° C et analysés dans les 24 heures de leur réception.

### 5. Paramètres mesurés et méthodes analytiques

#### 5.1. Méthode de recherche des STEC de sérotype O157 (figure III.4).

En 1998, la méthode analytique (SP-VG M1001) modifiée et validée par le laboratoire national de référence de l'IEV a permis aux laboratoires de diminuer la prévalence des faux positifs tout en conservant un seuil de détection bas (5 ufc/cm<sup>2</sup>).

La recherche des STEC O157 a consisté en une étape de pré-enrichissement des écouvillons dans 100 ml de milieu mTSB + novobiocine incubés à 42°C pendant 6 à 7 heures suivie d'une étape d'enrichissement en bouillon (Mac Conkey broth + cefixime (0,050 mg l<sup>-1</sup>) + tellurite de potassium (2,5mg l<sup>-1</sup>)) à 37°C pendant 18 heures.

Cent microlitres du bouillon ont été chauffés au bain marie à 100°C pendant 10 min et soumis à une étape d'immuno-essai-O157 (VIDAS<sup>™</sup>ECO). Sur les échantillons positifs au test VIDAS<sup>™</sup>ECO, une étape d'immuno-concentration (VIDAS<sup>™</sup> ICE ou Dynabeads O157, Invitrogen, Merlbeke) a été effectuée. Les échantillons positifs ont étéensemencés sur milieu sorbitol Mac Conkey (SMAC) et incubés 18 heures à 42°C. La confirmation de la présence de l'antigène O157 a été réalisée par agglutination des colonies isolées avec des particules de latex sensibilisées par des anticorps anti-O157 (Dry-Spot *E. coli* O157, Oxoid). La caractérisation biochimique a été menée grâce à des galeries API 20E (BioMérieux) pour l'identification de l'espèce.

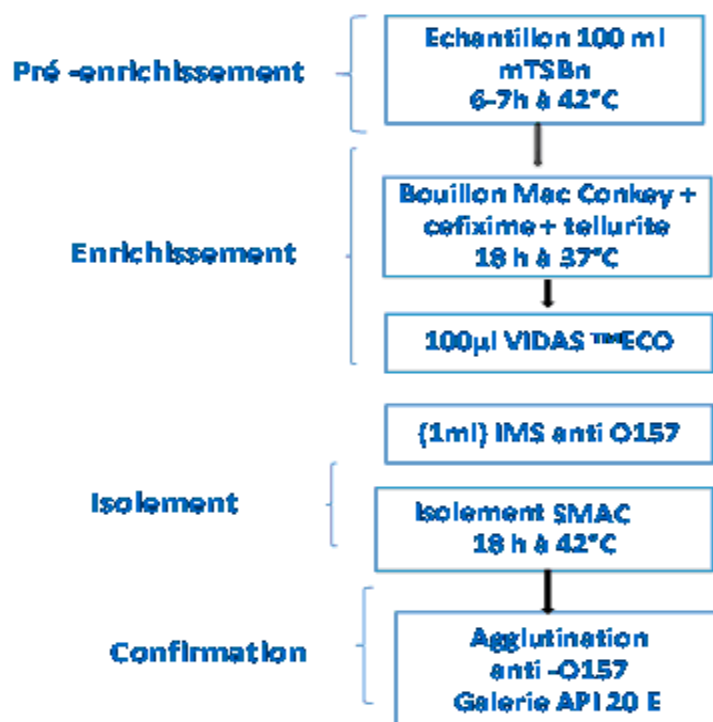


Figure III.4. Schéma d'isolement des STEC O157 (méthode SP-VG M001)

## 5.2. Recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence et caractérisation des souches O157 isolées.

Les souches *d'E. coli* de sérotype O157 ont été envoyées au laboratoire national de référence (UZ-Brussel) pour la recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence. Les méthodes utilisées sont référencées dans le tableau III.4 .

Caractérisation	Références
<i>Gènes stx et variants</i>	Karch et Meyer, 1989.
<i>Gène eae</i>	Gannon et al., 1993.
<i>Entérohémolysine</i>	Beutin et al., 1989.
<i>Antigène H7</i>	Farmer et Davis, 1985.
<i>Lysotype</i>	PHLS, Londres

Tableau III.4 : Caractérisation des *E. coli* O157:H7 isolés (Dr Piérard, UZ-Brussel)

### 5.3. Dénombrement des *E. coli* indicateurs de contamination fécale

Le dénombrement des *E. coli* a été réalisé par comptage des colonies violettes obtenues en milieu Rapid *E. coli* 2 (Sanofi Diagnostic Pasteur) après incubation 24 heures à 44°C (méthode AFNOR SDP-07/1-07/93). Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonies par centimètre carré (ufc/cm<sup>2</sup>).

## 6. Statistiques

En statistique descriptive, un **centile** est chacune des 99 valeurs qui divisent les données triées en 100 parts égales, de sorte que chaque partie représente 1/100 de l'échantillon de population.

La dénomination anglaise - **percentile** - est souvent utilisée abusivement avec une prononciation francisée. Ainsi, le percentile 75 est la valeur telle que 75% des données de dénombrement lui sont inférieurs. Cette statistique a été utilisée pour analyser la distribution des dénombrements d'*E. coli*.

Les fréquences ont été comparées par la statistique de chi-carré.

## III. Résultats

Un total de 6010 carcasses de bœuf a été échantillonné et analysé. Du fait du regroupement des écouvillons de 5 demi-carcasses en un seul échantillon, seule une estimation de la prévalence individuelle a pu être réalisée en 1998.

### 1. Résultats de la recherche et évaluation de la prévalence des *E. coli* O157

Neuf STEC O157 et une souche d'*E. coli* O157 (*stx*-) ont été détectées et isolées à partir des 1202 pools d'échantillons de carcasses. Ces 9 souches STEC O157 ont permis d'estimer la prévalence globale des carcasses entre 0,15 % (1 carcasse sur 5) et 0,75 % (5 carcasses sur 5). Si on considère qu'une seule des carcasses de chaque groupe était contaminée, ce qui est le plus plausible vu le faible taux de contamination, le taux de prévalence de 0,15 % peut être retenu.

### 2. Caractérisation des *E. coli* O157

Les propriétés des 9 souches pathogènes isolées ainsi que la souche (*stx*-) sont reportées dans le tableau 3.4. La caractérisation des gènes de virulence et le lysotypage des souches isolées ont été réalisés et nous ont été transmis par le laboratoire de référence (UZ-Brussel).

<i>souches O157 isolées</i>	<i>Sérotype</i>	<i>Lysotypes</i>	<i>Pathotypes</i>
<b>1</b>	O157:H7	RDNC	<i>stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>2</b>	O157:H7	RDNC	<i>stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>3</b>	O157:H7	RDNC	<i>stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>4</b>	O157:H7	4	<i>stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>5</b>	O157:H7	8	<i>stx<sub>-</sub>, eae, ehxA</i>
<b>6</b>	O157:H7	54	<i>stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>7</b>	O157:H7	54	<i>Stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>8</b>	O157:H7	54	<i>Stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>9</b>	O157:H7	RNC	<i>Stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>
<b>10</b>	O157:H-	8	<i>Stx<sub>2</sub>, eae, ehxA</i>

RDNC : réaction non conforme aux types de phages définis.

**Tableau n° III.5. Caractéristiques des STEC O157 isolés**

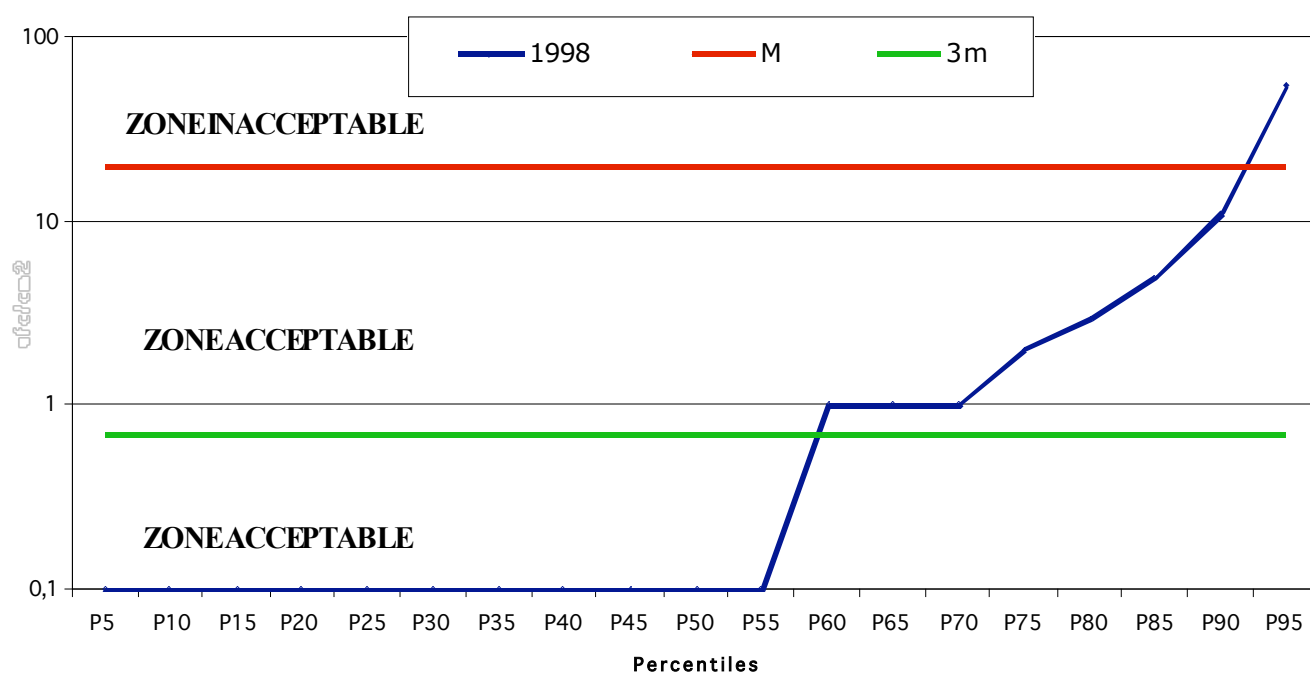
On constate que 90 % des souches sont du sérotype O157:H7 et que le pathotype majoritaire est *eae stx<sub>2</sub> ehxA* (80%). Une seule souche d'*E.coli* O157 est *stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> eae ehxA*. Les phages-types 54 (30%) et 8 (20%) sont les plus fréquents (Dr Piérard, UZ-Brussel)

### 3. Contamination par les *E. coli* totaux des carcasses de bœuf

Le nombre de *E. coli* a été calculé pour chaque lot de carcasses et exprimé en ufc/cm<sup>2</sup>.

A l'aide des résultats obtenus, une courbe de distribution des percentiles a pu être réalisée pour les échantillons de l'année 1998 (figure III.5). Si on considère le percentile 75, on constate qu'il est de 2 ufc/cm<sup>2</sup> ce qui est nettement supérieur à la valeur de 0,7 ufc/cm<sup>2</sup> définie pour la limite de satisfaction (m) dans le critère microbiologique légal à l'époque (Anonyme, 2002). De même, le percentile 95 est de 55 ce qui est également nettement supérieur à la valeur de 20 ufc/cm<sup>2</sup> du critère belge (Anonyme, 2002). Par conséquent, l'hygiène générale des carcasses bovines en Belgique semble être globalement inférieure aux exigences légales imposées par la suite par l'Union européenne.





Ufc **ufc** : unité formant colonies. **P95** : Percentile 95. **P 75** : percentile 75. **Min** : minimum. **Max** : maximum

**Figure III.5. Répartition des comptages en *E. coli* totaux par cm<sup>2</sup> de surface de carcasses de bœuf en 1998.**

#### 4. Niveau d'hygiène des entreprises échantillonnées ayant révélé la présence d'au moins un *STEC O157*

Le tableau III.6 présente les résultats obtenus après dénombrement des *E. coli* pour chaque entreprise échantillonnée ainsi que leur appréciation (S = satisfaisant; A= acceptable et NA = inacceptable) pour l'indicateur de contamination fécale (*E. coli*) en fonction des critères légaux belges.

Nombre d'échantillons								
Firme	Nombre de prélèvements	Nombre de STECO157	P75	P95	S	A	NA	Classe globale
Firme 1	12	2	4,7	58,4	4	5	3	NA
Firme 2	6	1	0,2	0,8	5	1	0	A
Firme3	52	1	3,4	42,8	17	30	5	NA
Firme 4	11	1	5,7	21,5	4	6	1	NA
Firme 5	4	1	19,8	40,8	1	2	1	NA
Firme 6	80	2	0,1	0,2	77	3	0	A
Firme 7	14	1	0,3	0,5	6	6	2	NA
Total, n=40	1202	9	2	55				

n: nombre de firmes, **P95**: percentile 95, **P75**: percentile 75, **S**: Satisfaisant; **A**: Acceptable; **NA** : inacceptable,

**Tableau III.6. Dénombrements des *E. coli* dans les firmes présentant au moins un échantillon contaminé par les *STEC O157* et classement selon les critères de l'AR du 28 août 2002.**

Pour le dénombrement d'*E. coli*, l'appréciation «S» correspond à une firme qui n'a obtenu aucun résultat supérieur à 0,7 ufc/cm<sup>2</sup>. L'appréciation «A» correspond à une firme ayant obtenu des résultats situés entre 0,7 et 20 ufc / cm<sup>2</sup> mais à raison de moins de 20 %. Enfin, «NA» est attribué aux entreprises ayant enregistré plus de 20 % des résultats dans cette zone ou au moins un résultat au-delà de 20.

Si on étudie la relation entre l'hygiène et la présence des *E. coli* O157:H7, on constate qu'aucune corrélation ne peut être établie (Chi-carré=0, 3).

De plus, si on considère les résultats individuels de chaque échantillon positif pour les STEC O157, la même conclusion peut être tirée (tableau III.7)

<i>carcasses positives</i>	<i>E. coli ufc/cm<sup>2</sup></i>	<i>Niveau d'hygiène</i>
<b>1</b>	0,9	A
<b>2</b>	0,2	S
<b>3</b>	46	NA
<b>4</b>	1	A
<b>5*</b>	0,1	S
<b>6</b>	0,1	S
<b>7</b>	3,1	A
<b>8</b>	0,1	S
<b>9</b>	0,1	S
<b>10</b>	2,9	A

ufc: unités formant colonies. S= satisfaisant (<0,7 ufc/cm<sup>2</sup>), A: acceptable (0,7 ≥ x ≥ 20 ufc/cm<sup>2</sup>), NA: non acceptable (>20 ufc/cm<sup>2</sup>), \*souche *stx* négative

**Tableau III.7. Nombre des *E. coli* totaux sur les carcasses positives pour les STEC O157**

#### **IV. Conclusions**

De ces résultats, il apparaît que, d'une part, contrairement aux résultats préliminaires de 1997, les STEC O157 sont bien présents en Belgique sur les carcasses de bœuf mais avec une prévalence très faible (probablement 0,15 ± 0,02 %). L'optimisation de la méthode de détection utilisée ainsi que le plus grand nombre d'échantillons analysés ont donné une meilleure détection des STEC O157.

Le groupage des échantillons, bien que permettant l'analyse d'un grand nombre de carcasses à moindre coût, n'a pas permis dans tous les cas de tracer la source de la contamination.

Même si la prévalence enregistrée de ce germe est très faible au cours de cette surveillance, elle n'écarte pas tout danger dans le pays. En effet, La caractérisation des souches isolées dans cette étude a permis de montrer qu'elles appartiennent aux mêmes sérotypes et lysotypes que les souches isolées en Belgique de bovins vivants ou d'hommes malades (Dr Piérard, UZ Brussel, 1997a).

Les priorités retenues à partir des résultats enregistrés pour l'année 1997 ont montré qu'il fallait rester très vigilant vis-à-vis de ce germe et insister plus encore sur sa recherche, non seulement sur un plus

grand nombre d'échantillons mais également sur une plus grande surface de prélèvement afin d'augmenter les chances de détecter des carcasses très faiblement contaminées. Des investigations en fin de filière pour les années qui ont suivi par exemple sur du filet américain non préparé prélevé en boucherie devaient permettre d'estimer plus précisément le risque réel pour le consommateur. D'autre part, les résultats des comptages d'*E. coli* totaux se sont montrés assez élevés par rapport aux critères microbiologiques suggérés ensuite par l'UE. En conséquence, des mesures correctrices ont été envisagées. Cependant, il n'existe aucune corrélation directe entre des taux élevés en *E. coli* totaux et la présence d'*E. coli* O157. En d'autres termes, le dénombrement d'*E. coli* totaux n'est pas un bon indicateur de la présence de STEC O157. Cependant, il faut constater que le niveau d'hygiène était mauvais en général avec une majorité de firmes ne satisfaisant pas aux critères microbiologiques pour les *E. coli*.

## **D. Plan de surveillance: années 1999-2004**

### **I. Justification du plan de surveillance.**

Les priorités fixées à partir des résultats obtenus en 1998, ont recommandé de rechercher les *E. coli* O157 sur un grand nombre d'échantillons et sur une plus grande surface écouvillonnée par carcasse. Le deuxième objectif recommandait d'effectuer en parallèle les recherches au stade de la consommation, en fin de filière (filet américain) compte tenu des pratiques qui favorisent la consommation de produits crus augmentant le risque de contaminations croisées. D'autres denrées alimentaires considérées comme des facteurs de risque potentiels ont été soumises périodiquement à la recherche des STEC O157. Ces deux approches ont été retenues pour la réalisation des plans de surveillance à partir de 1999.

Les études réalisées depuis 1997 avaient permis d'évaluer la prévalence de STEC O157 dans différentes filières de viandes fraîches notamment les filières considérées à risque. Tenant compte des résultats obtenus au cours des années précédentes, des priorités ont été retenues pour les années qui ont suivi à savoir:

1. La réalisation des prélèvements d'échantillons dans un plus large panel d'entreprises ainsi qu'une augmentation du nombre d'échantillons par entreprise : un minimum de 5 échantillons indépendants par entreprise a été prélevé et une pondération globale du nombre d'échantillons par entreprise a été réalisée par rapport aux volumes de production.
2. Une évaluation du danger au stade du consommateur. Ainsi, des prélèvements des différents échantillons à ce stade (grandes surfaces, boucheries) ont permis une bonne approche de son exposition au germe pathogène.

En 2001, une procédure d'alerte prescrivant la rédaction d'un formulaire d'alerte a été établie pour les laboratoires dans le cas où la présence d'un *E. coli* O157 était détectée. La bonne spécificité de la méthode a permis de déclencher l'alerte avant de recevoir la confirmation de la virulence des souches.

D'autre part, afin d'harmoniser les contrôles de l'hygiène, la commission européenne a publié la décision 2001/471/CE (Anonyme, 2001a) applicable à partir du 1<sup>er</sup> juillet 2002, établissant les règles générales applicables au contrôle régulier de l'hygiène générale des établissements conformément à la directive 64/433/CEE (Anonyme, 1964). L'annexe de cette décision 2001/471/CE décrit l'échantillonnage bactériologique des carcasses (de bovins, porcins, caprins et équidés) dans les abattoirs ainsi que celui des contrôles du nettoyage et de la désinfection. Elle décrit aussi les différentes méthodes d'échantillonnage (méthode destructive et non destructive) ainsi que les

méthodes de gestion et de traitement de résultats. La méthodologie à utiliser en Belgique a été décrite dans l'AR du 28 août 2002 (Anonyme, 2002) modifiant l'AR du 4 juillet 1996.

Les résultats des dénombrements des *E. coli* pour les échantillons positifs pour les STEC O157 ont été analysés par rapport aux critères proposés pour le contrôle de l'hygiène (IEV, 2000).

En 2003, une meilleure traçabilité des produits prélevés devait être enregistrée par le biais de l'intégration au sein de l'AFSCA des différents services d'inspection des Ministères de la santé publique et de l'agriculture ce qui a facilité la réalisation d'enquêtes.

Les souches STEC O157 devaient être systématiquement typées pour connaître les filières contaminées et détecter précocement l'émergence des souches en parallèle avec les enquêtes menées chez l'homme. Les souches devaient être conservées au LNR et, après accord de l'AFSCA, mises à la disposition de toute équipe chargée d'effectuer des examens complémentaires.

Un autre objectif de ces plans de surveillance était de constituer une base de départ pour une réelle évaluation des risques microbiologiques (STEC O157 dans notre cas) liés aux denrées alimentaires d'origine animale au sein de la nouvelle Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA).

En 2004, deux nouveaux textes législatifs datant du 11 novembre 2003 ont été publiés par le Parlement et le Conseil européens et traitent des zoonoses. Il s'agit de la directive 2003/99/CE (CE, 2003a) sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques et le règlement (CE) N°2160/2003 (CE, 2003b) sur le contrôle des agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.

Dans ce cadre, chaque Etat-membre est chargé de collecter des données pertinentes concernant les principaux agents zoologiques et d'en faire rapport au comité vétérinaire permanent et à la Commission européenne.

## **II. Plan d'échantillonnage et méthodologie de recherche des STEC O157**

Le plan d'échantillonnage a été adopté pour chaque année sur base des résultats antérieurs afin de pouvoir évaluer au mieux les évolutions en matière de prévalence des STEC de sérotype O157 dans les matrices choisies. Les plans d'échantillonnage ont été établis en concertation avec les cellules concernées de l'IEV intégré dans l'AFSCA. Les échantillons ont été prélevés par des agents de l'AFSCA spécialement formés.

### **1. Matrices investiguées et nombres d'entreprises échantillonnées**

En 1999, les STEC O157 ont été recherchés au niveau des matrices de bovins (carcasses et viandes hachées) et des poissons entiers (chair et peau).

En 2000, les recherches des STEC O157 ont été effectuées sur des échantillons de carcasses bovines, de carcasses de veaux, de viandes hachées de bœuf ainsi que sur des échantillons de porcs (carcasses, viandes de découpe et viandes hachées). Chaque carcasse écouvillonnée représentait un échantillon individuel. L'âge, le sexe et le numéro Sanitel des bovins ont été enregistrés afin de coupler cette surveillance avec des prélèvements de matières fécales réalisés par le Ministère de l'Agriculture, dans les abattoirs et/ou dans les exploitations.

En 2001, les recherches ont été effectuées sur les échantillons de bovins (carcasses, viandes hachées), de volailles (carcasses de poulets, filets de poulets et carcasses de poules).

De 2002 à 2004, les mêmes matrices ont été choisies prioritairement pour évaluer l'évolution de la situation en Belgique. Les recherches des STEC O157 ont été effectuées uniquement sur les échantillons de bovins (carcasses, viandes de découpe et viandes hachées) (tableau III.8).

L'ensemble des matrices testées par année pour la présence des STEC O157 est présenté dans le tableau III.8

Espèce	Matrice	Quantité analysée	Nombres d'échantillons par année					
			1999	2000	2001	2002	2003	2004
<b><u>Bovin</u></b>	carcasses	1600 cm <sup>2</sup>	1984	1501	1388	1215	1479	1337
	découpe	25 g				222	285	244
	viande hachée	25 g	974	487	298	297	298	234
<b><u>Veau</u></b>	carcasses	1600 cm <sup>2</sup>		157				
<b><u>Porc</u></b>	carcasses	1600 cm <sup>2</sup>		136				
	découpe	25 g		163				
	Viande hachée	25 g		159				
<b><u>Poulet</u></b>	Carcasses	25 g			243			
	filets	25 g			181			
<b><u>Poule</u></b>	Carcasse	25 g			152			
<b><u>Poisson</u></b>	chair	25g	131					

**Tableau III.8. Matrices prélevées pour la recherche de STECO157 (1999-2004)**

Le tableau III.9 reprend le nombre d'entreprises ayant fait l'objet de prélèvements.

<i>Espèce</i>	<i>Matrices</i>	<i>Nombres d'entreprises par année</i>					
		<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>Bovin</b>	carcasses	45	73	87	47	46	ND
	découpe				38	43	ND
	haché	50	49	59	32	29	ND
<b>Veau</b>	carcasses						
<b>Porc</b>	carcasses	28	40				
	découpe	34	53				
	Viande haché	34	61				
<b>Poulet</b>		30		17			
<b>Poule</b>				4			
<b>Poisson</b>		18					

ND non disponible

**Tableau III.9. Nombre d'entreprises échantillonnées (1999-2004)**

## 2. Types et méthodologie d'échantillonnage

### 2.1. Ecouvillonnage des carcasses de bœuf, veaux et porcs

La technique d'écouvillonnage des carcasses bovines et des carcasses de porcs est la méthode décrite dans l'arrêté royal du 28 août 2002 modifiant l'arrêté royal du 4 juillet 1996. Les carcasses de bœufs et de veaux ont été écouvillonnées au niveau des quatre sites (figure III.2) à raison de 1600 cm<sup>2</sup> par carcasse (400 cm<sup>2</sup> par zone). Les carcasses de porcs ont été écouvillonnées sur une surface de 600 cm<sup>2</sup> (figure III.1).

### 2.2. Viandes

Les viandes hachées ont été prélevées au stade de la production ou de la distribution. Le prélèvement par échantillon était de minimum 100 grammes.

Les carcasses de poulet et de poule ont été prélevées à la sortie des abattoirs ou au stade de la distribution au consommateur. Vingt-cinq grammes (25 g) de peau (du cou au bréchet, sans atteindre le cloaque) des carcasses de poules et poulets constituent la prise d'essai.

Les filets de poulet (sans peau ni os) ont été prélevés à la sortie des ateliers de production ou au stade de la distribution au consommateur.

Les poissons entiers d'eau douce ont été analysés en sortie de production.

Chaque fois vingt-cinq grammes ont été prélevés au laboratoire pour la prise d'essai.

### 3. Transport

Les échantillons ont été transmis sous température entre 0 et 4°C et analysés au laboratoire le jour de leurs prélèvements ou dans les 24 heures de leur réception. Les analyses ont toutes été réalisées au niveau des cinq laboratoires précédemment cités.

### 4. Paramètres et méthodes analytiques

La recherche des STEC de sérotype O157 a été effectuée par la méthode SP-VG M001 comme décrite ci-avant (figure III.4.).

Les souches d'*E. coli* isolées ont été envoyées au laboratoire national de référence (UZ-Brussels) pour la détermination des facteurs de virulence.

Le dénombrement des *E. coli* a été effectué par comptage des colonies obtenues en milieu Rapid *E. coli* 2 (BioRad) après incubation 24 heures à 44°C (méthode AFNOR SDP-07/1-07/93). Tous les résultats sont exprimés en nombre d'ufc/cm<sup>2</sup> (surfaces de carcasses) ou nombre d'ufc/g.

## **III. Résultats**

### 1. Prévalence des STEC O157

En 1999, à partir des 1984 carcasses de bœuf écouvillonnées, la détection de l'antigène O157 a été observée dans 199 cas (VIDAS +) soit 10,03 % et la culture des souches a conduit à l'obtention de 25 souches de STEC O157:H7 ou O157:H- soit une prévalence égale à 1,3 %.

D'autre part, 974 viandes hachées de bœuf ont été analysées et dans 55 cas, l'antigène O157 a été détecté (VIDAS +) soit 5,6 %. Les cultures de confirmation ainsi que la recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence a conduit à l'isolement d'une seule souche STEC O157 soit une prévalence de 0,1 %. Aucun *E. coli* O157 n'a été détecté à partir des matrices de poisson.

En 2000, 1501 carcasses de bœuf ont été écouvillonnées. L'antigène O157 a été détecté (VIDAS ECO) dans 6,0 % des échantillons. Six souches de STEC O157 ont été mises en évidence soit une prévalence de 0,4 %. Une souche possédant les gènes de virulence (*eae*, *stx<sub>1</sub>*, *ehxA*) et de sérotype non identifié a aussi été mise en évidence. Elle n'appartient à aucun des sérotypes considérés comme les plus fréquemment rencontrés (O145, O111, O103 et O26).

L'antigène O157 a été détecté (VIDAS) dans 2,9 % des échantillons de viandes hachées de bœuf mais seule une souche STEC O157 a pu être détectée dans un échantillon prélevé en grande surface soit une prévalence de 0,2 %. De nouveau, aucun STEC O157 n'a été isolée à partir des autres matrices.



En 2001, à partir des 1388 carcasses de bœuf analysées, 13 souches STEC O157 ont été isolées soit une prévalence de 0,94 %. Toujours aucune souche n'a été détectée à partir des autres matrices.

En 2002, A partir des 1215 carcasses échantillonnées, treize souches de STEC O157 ont été isolées soit une prévalence de 1,07 %. Aucune souche de STEC O157 n'a été isolée à partir des découpes de bœuf et des viandes hachées de bœuf.

En 2003, 1479 carcasses de bovins ont été écouvillonnées. Dix souches STEC O157 (0,74 %) ont été isolées. Parmi-elles, 8 souches possèdent le gène *stx<sub>2</sub>* et deux les gènes *stx<sub>1</sub>* et *stx<sub>2</sub>*. Cinq souches STEC O157:H7 ou H- ont été isolées des 298 échantillons de viandes hachées testées (1,68 %). Quatre possèdent le gène *stx<sub>2</sub>* et une souche *stx<sub>1</sub>* et *stx<sub>2</sub>*. Deux souches STEC (*stx<sub>1</sub>* et *stx<sub>2</sub>*) ont été isolées à partir des 285 viandes de découpe testées soit une prévalence de 0,70 %. Toutes les souches STEC isolées sont positives pour les gènes *eae* et *ehxA*.

En 2004, 1337 carcasses de bœuf ont été écouvillonnées. Dix-huit souches de STEC O157 ont été mises en évidence, soit une prévalence de 1,4 %. Dix-sept souches sont positives pour le gène *stx<sub>2</sub>* et une souche est positive pour les gènes *stx<sub>1</sub>* et *stx<sub>2</sub>*. Deux souches STEC O157 (*stx<sub>2</sub>* *eae* *ehxA*) ont été mises en évidence dans les découpes de bœuf (2/244) soit une prévalence de 0,8 %, mais aucune dans la viande hachée de bœuf (0/234).

## 2. Propriétés des souches d'*E. coli* pathogènes isolées : sérotypages et caractérisation des facteurs de virulence.

Les tableaux III.10 et III.11 montrent l'évolution de la prévalence des STEC O157 pour la période 1999 à 2004 dans les viandes, les viandes hachées et sur les carcasses.

Années	Matrices	Nombres de souches/nombre de prélèvements	Prévalences (%)
<b>1999</b>	Carcasses	25/1984	1,26
	Viandes hachées	1/974	0,1
<b>2000</b>	Carcasses	6/1504	0,4
	Viandes hachées	1/487	0,2
<b>2001</b>	Carcasses	13/1388	1,08
	Viandes hachées	0/298	0
<b>2002</b>	Carcasses	13/1215	1,07
	Viandes hachées	0/297	0
	Découpe	0/222	0
<b>2003</b>	Carcasses	10/1497	0,82
	Viandes hachées	5/298	1,68
	Découpes	2/285	0,70
<b>2004</b>	Carcasses	18/1337	1,35
	Découpe	2/244	0,8
	Viandes hachées	0/234	0

**Tableau III.10. Prévalences des STEC O157 dans les matrices bovines (1999- 2004)**

Si on compare les prévalences obtenues sur les carcasses bovines pour les différentes années (tableau III.11), on constate que la prévalence pour l'année 2000 est significativement inférieure à celle des années 1999, 2001, 2002 et 2004. Alors qu'entre les autres années, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

<i>Année</i>	<i>Nombre de carcasses</i>	<i>Nombre de positifs</i>	<i>Prévalence (%)</i>	<i>00</i>	<i>01</i>	<i>02</i>	<i>03</i>	<i>04</i>
<b>1999</b>	1984	25	1,26 %	SS*	NS	NS	NS	NS
<b>2000</b>	1501	6	0,4 %		S*	S*	NS	SS**
<b>2001</b>	1388	13	0,93 %			NS	NS	NS
<b>2002</b>	1215	13	1,07 %				NS	NS
<b>2003</b>	1215	10	0,82 %					NS
<b>2004</b>	1337	18	1,35 %					

\$ :  $p < 0,05$  SS\*\* significatif :  $p < 0,01$  NS: Non significatif

**Tableau III.11. Comparaison des prévalences des STEC O157 sur les carcasses bovines.**

Le tableau III.12. reporte les différentes caractéristiques (sérotypes et pathotypes) des souches STEC isolées dans les denrées alimentaires pour les périodes de 1999 à 2004.

<b>Sérotipe</b>	<b>Pathotype</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>Total</b>	<b>Total %</b>
O157:H7	<i>eae stx<sub>2</sub> ehxA</i>	19	5	6	12	10	19	71	74 %
O157:H7	<i>eae stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA</i>	1	0	4	0	6	1	12	12,5 %
O157:H-	<i>eae stx<sub>2</sub> ehxA</i>	3	0	1	0	0	0	4	4,16 %
O157:H-	<i>eae stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA</i>	3	1	2	1	1	0	8	8,33 %
<b>ND</b>	<i>eae stx<sub>1</sub></i>		1					1	
<b>Total</b>		<b>26</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>96</b>	<b>100 %</b>

ND: sérotype non déterminé

**Tableau III.12. Caractéristiques des STEC O157 isolées de 1999 à 2004**

### 3. Répartition des prélèvements positifs en fonction du temps et de la firme

Il est intéressant de vérifier si des carcasses positives proviennent de mêmes firmes, le même jour.

A titre d'exemple, le tableau III.13 montre la situation pour les prélèvements en 1999.

<i>Date de prélèvement</i>	<i>Firme</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Nombre de STEC O157</i>
23/06/99	1	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
12/10/99	1	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	6
17/05/99	2	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
15/06/99	2	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	2
21/06/99	2	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
23/08/99	2	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	2
30/08/99	2	<i>O157:H-; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	2
17/08/99	3	<i>O157:H-; eae stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	2
5/05/99	4	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
14/07/99	5	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
4/08/99	5	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	1
30/08/99	6	<i>O157:H7; eae stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub>; entérohémolysine+</i>	1
29/09/99	7	<i>O157:H7; eae stx<sub>2</sub> entérohémolysine+</i>	3
5/08/99	8	<i>O157:H-; eae stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub>; entérohémolysine+</i>	1

**Tableau III.13. Répartition des prélèvements positifs en fonction du temps et de la firme en 1999**

Si on examine la répartition des prélèvements positifs en fonction des firmes et des dates de prélèvements (tableau III.13), on constate que les 25 prélèvements positifs se répartissent dans 8 firmes différentes. La firme 1 présente 7 prélèvements positifs et la firme 2 en compte 8. De plus, on constate qu'en date du 12/10/99, 6 prélèvements étaient positifs dans la firme 1.

De même, 3 prélèvements positifs, en date du 29/09/99, dans la firme 7 et 2 prélèvements positifs à chaque fois dans la firme 2 en date du 23/08/99; du 30/08/99 et du 17/08/99. De plus, les souches isolées le même jour dans la même firme avaient les mêmes caractéristiques (sérotypage, pathotypage). Il serait intéressant de recourir à des techniques plus discriminantes (PFGE, lysotypage) pour mieux comprendre les sources de ces contaminations multiples.

#### 4. Dénombrement des *E. coli* totaux.

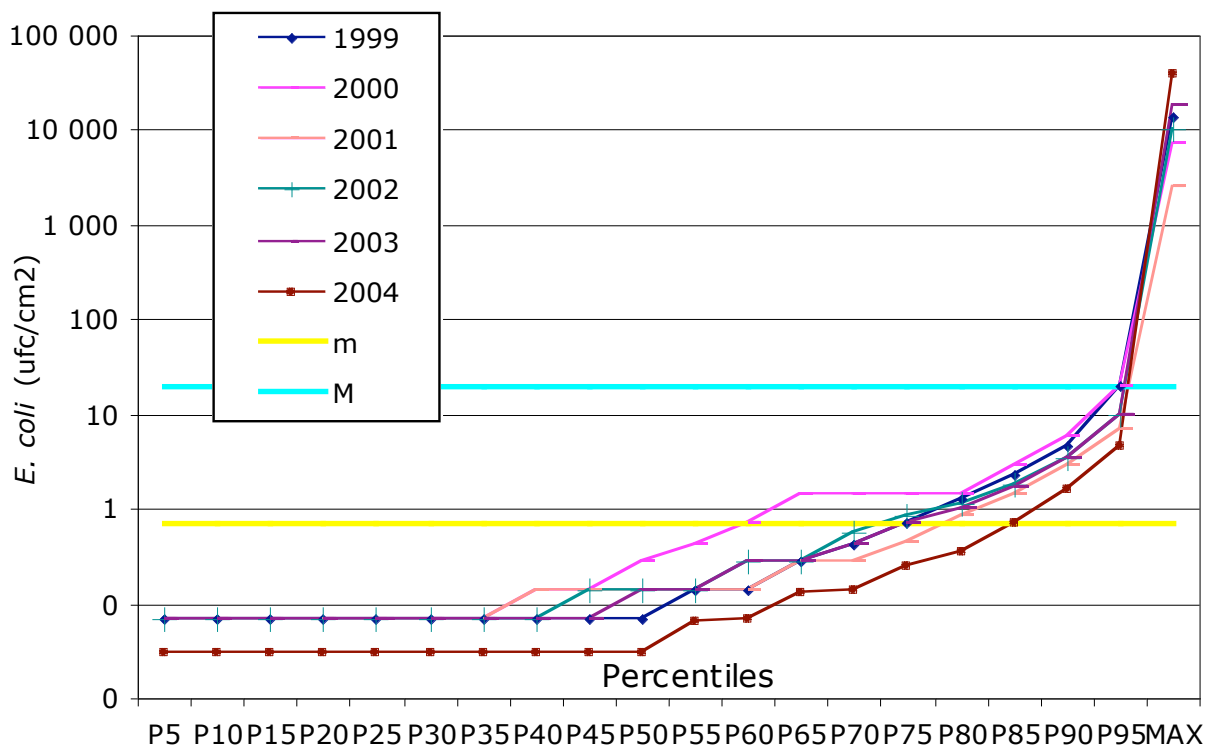
##### 4.1. Les carcasses bovines.

Le dénombrement des *E. coli* totaux a été réalisé à partir des écouvillonnages des carcasses bovines. Les résultats ont été exprimés en ufc/cm<sup>2</sup> et distribués en percentiles (tableau III.14 et figure III.6). On constate que le percentile 75 est supérieur à la limite « m » du critère microbiologique légal de 0,7 ufc/cm<sup>2</sup> pour les années 2000 et 2002, il est égal au critère pour les années 1999 et 2003 et inférieur pour les années 2001 et 2004. Par contre, tous les percentiles 95 sont inférieurs à la limite « M » du critère microbiologique de 20 ufc/cm<sup>2</sup>

Année	MIN (ufc/cm <sup>2</sup> )	P75 (ufc/cm <sup>2</sup> )	P95 (ufc/cm <sup>2</sup> )	MAX (ufc/cm <sup>2</sup> )
1999	< 0,14	0,7	19	14 000
2000	< 0,14	1,4	20	7 000
2001	< 0,14	0,46	7,0	2 500
2002	< 0,14	0,84	9,9	10 000
2003	< 0,14	0,7	9,9	18 000
2004	< 0,06	0,25	4,6	39 000

Min : valeur minimale. Max : valeur maximale. P75: percentile 75. P95 : percentile 95. ufc : unités formant colonies

**Tableau III.14. Répartition des dénombrements des *E. coli* totaux sur les carcasses de bœuf (1999-2004)**



ufc/cm<sup>2</sup> : unité formant colonies par centimètre carré. P : percentile. m : limite inférieure de satisfaction (0,7 ufc). M : limite supérieure d'acceptabilité (20 ufc),

**Figure III.6. Répartition des comptages des *E. coli* totaux par cm<sup>2</sup> de surfaces de carcasses de bœuf pour les années 1999 à 2004.**

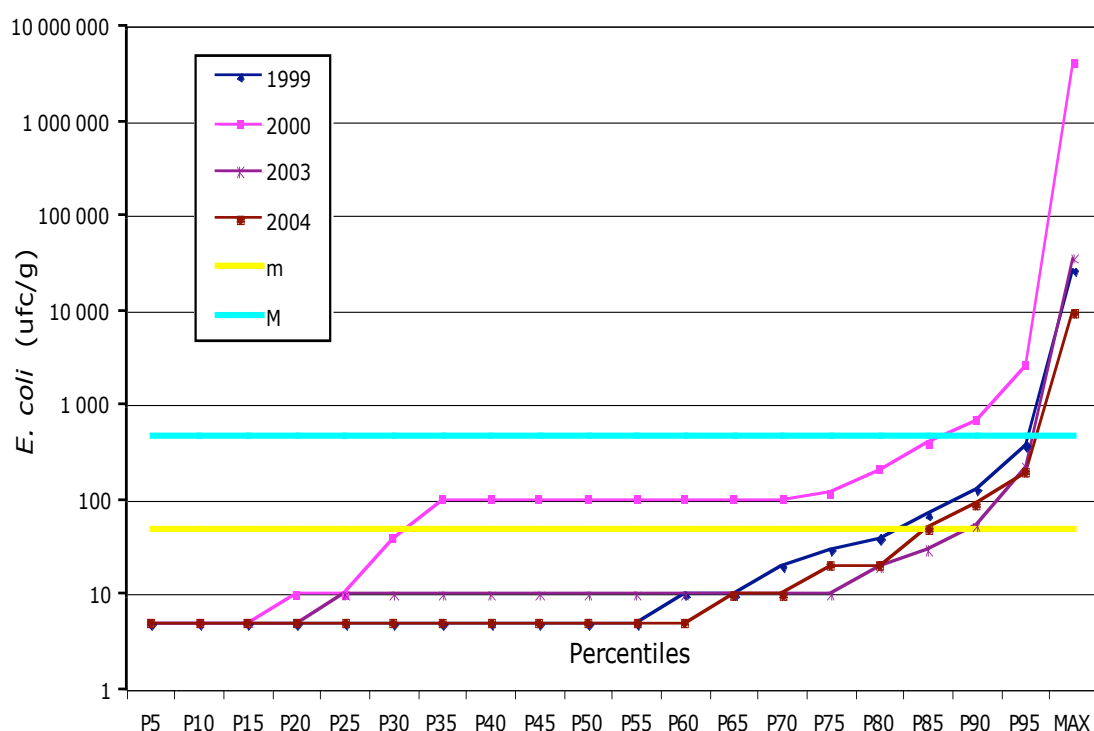
#### 4.2. La viande hachée de bœuf.

Les limites du critère microbiologique pour la viande hachée sont une limite inférieure de 50 ufc/g et une limite supérieure de 500 ufc/g (arrêté royal du 4 juillet 1996 ; Règlement (CE) N°2073/2005). Le tableau III.15 et la figure III.7 reprennent les valeurs de dénombrement des *E. coli* dans les viandes hachées pour les années 1999, 2000, 2003 et 2004 qui sont les années pour lesquelles les STEC O157 ont été recherchés dans cette matrice.

Année	MIN (ufc/g)	P75 (ufc/g)	P95 (ufc/g)	MAX (ufc/g)
1999	< 10	30	390	27 000
2000	< 10	120	2 600	4 000 000
2003	< 10	10	220	36 000
2004	< 10	20	200	9 600

ufc/g : unités formant colonies. P75 : percentile 75, P95 : percentile 95, Min: valeur minimale, Max: valeur maximale

**Tableau III.15. Valeurs des dénombrements des *E. coli* dans les viandes hachées de bœuf**



Ufc/gramme : unité formant colonies par gramme, P : percentile, m : limite inférieure de satisfaction (50 ufc), M : limite supérieure d'acceptabilité (500 ufc/g),

**Figure III.7 : Répartition des comptages des *E. coli* totaux par gramme de viande hachée de bœuf en 1999, 2000, 2003 et 2004.**

Si on considère les dénombrements d'*E. coli* au niveau des viandes hachées, on constate que les critères sont respectés chaque année sauf en 2000 (tableau III.15, figure III.7).

Etant donné la prévalence des STEC O157 observée en 2003 (1,67%), il est intéressant de vérifier si cette année présentait une hygiène significativement moins bonne par rapport aux autres années et ce n'était pas le cas, bien au contraire.

#### 4.3. Relation entre la présence des STEC O157 et le dénombrement des *E. coli* totaux

Il s'agissait de répondre à la question suivante : les échantillons positifs pour les STEC O157 sont-ils plus contaminés par *E. coli* que les autres? Si on regarde les matrices positives pour STEC O157 (tableau III.16), on constate que la plupart (60 % ou 49/86) des carcasses sont d'une hygiène satisfaisante ( $<0,7$  ufc/cm<sup>2</sup>). Seulement 9,3 % (8/86) des carcasses positives pour les STEC O157 ont un niveau d'hygiène inacceptable ( $> 20$  ufc/cm<sup>2</sup>).

Année	Matrice	Nombre d'E. coli	Nombre STEC O157	Niveau d'hygiène
1999	Viande hachée	12 ufc/g	1	S
	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	14	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	8	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	3	NA
2000	Viande hachée	100 ufc/g	1	A
	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	3	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	3	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	1	NA
2001	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	8	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	5	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	0	NA
2002	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	9	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	4	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	0	NA
2003	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	5	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	4	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	1	NA
	Viande hachée	<50 ufc/g	2	S
	Viande hachée	50 ≤ x ≤ 500 ufc/g	0	A
	Viande hachée	>500 ufc/g	1	NA
	Filet américain	129 900 ufc/g	1	NA
	Filet américain	<10 ufc/g	1	S
2004	Découpe	<10 ufc/g	1	S
	Découpe	40 ufc/cm <sup>2</sup>	1	S
	Carcasse	<0,7 ufc/cm <sup>2</sup>	9	S
	Carcasse	0,7 ≤ x ≤ 20 ufc/cm <sup>2</sup>	6	A
	Carcasse	>20 ufc/cm <sup>2</sup>	3	NA
	Découpe	30 ufc/g	1	S
	Découpe	0,1 ufc/g	1	S

Ufc : unité formant colonie, S : Satisfaisant; A : Acceptable; NA : Non acceptable

**Tableau III.16. Niveau de contamination par *E. coli* des échantillons positifs pour les STEC O157 et interprétation par rapport aux critères réglementaires**

Une autre façon de poser la question est de se demander si les firmes ayant présenté des matrices positives à STEC O157 étaient d'un niveau d'hygiène moindre que les autres firmes? Pour l'année 1999, il y a une association entre le taux d'hygiène des firmes et le fait d'isoler une souche de STEC ( $\chi^2=6,5$   $P<0,05$ ). Il en est de même pour l'année 2000 ( $\chi^2=6$ ,  $P<0,05$ ) et pour l'année 2001 ( $\chi^2=6,55$ ,  $p<0,05$ ) (tableau III.17). Par contre pour l'année, 2002 aucune association n'a pu être mise en évidence ( $\chi^2=1,6$ ,  $P>0,05$ ). Il ressort des résultats de 1998 à 2002, que l'utilisation du dénombrement d'*E. coli* comme élément prédictif de la présence de STEC O157 sur les carcasses bovines est non

pertinent dans la mesure où cette association n'est pas systématique et que la dose infectieuse des STEC O157 est inférieure au seuil de détection de la méthode de dénombrement.

Année	Firme	STEC O157	E. coli (ufc/cm <sup>2</sup> )	P75 (ufc/cm <sup>2</sup> )	P95 (ufc/cm <sup>2</sup> )	Nbre d'échantillons			Niveau d'hygiène
						S	A	NA	
1999	n=45	25 STEC O157		0, 7	19, 6	n=12	n=8	n=25	
	4	O157:H7 eae stx2	0, 14	0, 91	5, 97	51*	20*	1*	NA
	2	O157:H7 eae stx2	0, 98	0, 14	4, 23	244*	19*	11*	NA
		O157:H7 eae stx2	1, 83						
		O157:H7 eae stx2	4, 5						
		O157:H7 eae stx2	0, 28						
		O157:H7 eae stx2	0, 42						
		O157:H7 eae stx2	0, 14						
		O157:H- eae stx2	0, 14						
	1	O157:H- eae stx2	0, 42	0, 73	10, 75	36*	11*	1*	NA
		O157:H7 eae stx2	0, 84						
		O157:H7 eae stx2	0, 56						
		O157:H7 eae stx2	0, 14						
		O157:H7 eae stx2	2, 95						
		O157:H7 eae stx2	0, 14						
	7	O157:H7 eae stx2	0, 14	5, 66	149, 06	93*	70*	31*	NA
		O157:H7 eae stx2	23, 63						
		O157:H7 eae stx2	239, 74						
	5	O157:H7 eae stx2	0	2, 6	38, 57	41*	17*	4*	NA
		O157:H7 eae stx2	2, 81						
	3	O157:H- eae stx1 stx2	0	0, 7	7, 74	36*	11*	1*	NA
		O157:H- eae stx1 stx2	0, 28						
	6	O157:H7 eae stx1 stx2	2, 81	7, 03	9, 6	2*	4*	0*	NA
	8	O157:H- eae stx1 stx2	12, 24	0, 98	2, 67	42*	18*	1*	NA
2000	n=73	6 STEC O157 + 1 non O157		1, 4	19, 7	n=18	n=14	n=41	
	9	O157:H7 eae stx2	0	0, 14	2, 79	29*	3*	0*	A
	4	ND* eae stx1	5, 21	2, 08	5, 42	12*	7*	0*	NA
	10	O157:H-eae stx1 stx2	0, 56	2, 71	9, 42	9*	13*	1*	NA
	11	O157:H7 eae stx2	6, 06	0, 56	17, 48	26*	4*	2*	NA
	12	O157 H7 eae stx2	0, 99	3, 73	19, 69	13*	22*	5*	NA
	1	O157:H7 eae stx2	47, 89	38, 03	2112, 7	5*	23*	11*	NA
	13	O157:H7 eae stx2	0, 56	1, 87	5, 23	23*	15*	1*	NA
	2001	13 STEC O157		0, 46	7, 04	n=30	n=17	n=40	
		O157:H7 eae stx2	0	0, 42	11, 4	36*	9*	2*	NA
		O157:H7 eae stx2	0						
		O157:H7 eae stx1 stx2	2	1, 02	24, 22	28*	22*	11*	NA
		O157:H- eae stx1 stx2	3						
		O157:H7 eae stx2	0, 14	1, 87	49, 38	26*	12*	3*	NA
		O157:H7 eae stx2	0, 42	0, 63	8, 98	44*	12*	2*	NA
		O157:H7 eae stx2	14, 37	0	0, 42	69*	3*	0	A
		O157:H7 eae stx2	0	0, 25	1, 19	54*	4*	0	A
		O157:H- eae stx2	0, 56						
	19	O157H7 eae stx1 stx2	8, 59	0, 1	5, 04	9*	1*	0*	A
		O157:H7 eae stx-	0						
	13	O157:H- eae stx1 stx2	5, 49	1, 41	7, 52	45*	13*	3*	NA
	20	O157:H7 eae stx1 stx2	0, 42	0, 35	3, 58	6*	1*	0*	A
		O157:H7 eae stx1 stx2	0, 28						
2002	n=47	13 STEC O157		0, 84	9, 9	n=6	n=18	n=23	
	21	O157:H7 eae stx2	1, 68	1, 33	1, 99	18*	4*	0*	A
	22	O157 H- eae stx1 stx2	0	0	0, 28	18*	0*	0*	S
	23	2 O157 :H7 eae stx2	4, 2 19, 6	0, 7	4, 48	11*	4*	1*	NA
	24	2 O157 :H7 eae stx2	0, 28 0, 28	0, 14	0, 28	21*	0*	0*	S
	14	4 O157 : H7 eae stx2	0, 14 0, 14 0 0, 28	0,391	27, 2	15*	5*	2*	NA
	18	O157 :H7 eae stx2	0	0, 14	2, 41	23*	3*	0*	A
	12	O157:H7 eae stx2	0, 84	0, 14	1, 41	7*	1*	0*	A
	25	O157:H7 eae stx2	0	2, 59	12, 86	13*	5*	1*	NA



S (satisfaisant):  $< 0,7$  ufc/cm<sup>2</sup>; A (acceptable):  $0,7 \leq x \leq 20$  ufc/cm<sup>2</sup>; NA (non acceptable)  $> 20$  ufc/cm<sup>2</sup>; n=nombre d'entreprises échantillonnées, \* nombre de résultats de dénombrements d'*E. coli* répartis en fonction des critères réglementaires.

**Tableau III.17. Niveau de contamination par *E. coli* des firmes ayant permis d'isoler des STEC O157 au niveau des carcasses bovines de 1999 à 2002.**

#### **IV. CONCLUSIONS**

En 1999, la modification de la méthode analytique ainsi que l'augmentation des surfaces échantillonnées (1600 cm<sup>2</sup> au lieu de 400 cm<sup>2</sup>) ont permis aux laboratoires de diminuer la prévalence des faux positifs tout en conservant un seuil de détection bas (1-5 ufc/25g ou par cm<sup>2</sup>) et d'optimiser la méthode de détection des STEC O157. La prévalence des STEC O157 sur les carcasses varie de 0,4 % en 2000 et 1,35 % en 2004 avec une moyenne de 1,00 %.

Au niveau de la viande hachée, la prévalence varie entre 0 % en 2004 et 1,67 % en 2003 avec une moyenne de 0,33 %. Au niveau des carcasses et des viandes de découpe, on observe que le taux de contamination a varié de façon significative. Paradoxalement, le niveau d'hygiène des entreprises s'est amélioré depuis 1999 et les carcasses présentent un niveau moindre de contamination d'origine fécale. Cette amélioration de l'hygiène s'accompagne d'une augmentation de l'association des hauts niveaux d'*E. coli* totaux avec la présence d'une souche de STEC O157. Cependant, pour l'année 2002, on n'a pas constaté de relation entre le niveau d'hygiène de l'entreprise et le fait d'isoler des STEC O157. Cependant, on n'a pas pu mettre en évidence un plus haut taux de STEC O157 dans les établissements montrant une déficience de l'hygiène par rapport aux autres. De plus, 60 % des carcasses présentant un STEC O157 avaient un niveau d'hygiène satisfaisant alors que seulement 9% des carcasses positives avaient un niveau d'hygiène inacceptable. Donc, dans la plupart des cas, le niveau de contamination par les STEC O157 est faible mais il faut rappeler que même de bas niveaux de contaminations présentent un risque réel pour le consommateur à cause de la faible dose infectieuse de ce pathogène.

En conclusion, il semble que le résultat du dénombrement des *E. coli* ne soit pas un bon indicateur de la présence d'une souche de STEC O157 mais qu'il permet d'évaluer les pratiques de l'établissement. Réduire globalement la contamination par *E. coli* ne peut que réduire le niveau de contamination par les STEC O157 et donc le risque pour la santé publique lié à ce pathogène.

Après confirmation de la présence de STEC O157 au niveau des carcasses de bœuf, des enquêtes ont été menées au niveau des fermes d'origine des animaux positifs grâce au système d'alerte mis en œuvre et au système de traçabilité «Sanitel». Les recherches au niveau des sept troupeaux ont permis de retrouver STEC O157 (*stx*<sub>2</sub>+, *eae*+) dans trois des troupeaux, *E. coli* O157 (*stx*<sub>2</sub>+, *eae* -) dans deux autres et *E. coli* (*stx*<sub>2</sub>, *eae* +) non typable par les sérotypes courants dans un cinquième troupeau. Aucun STEC n'a été isolé au niveau du septième troupeau (résultats non montrés).

Par ailleurs, la présence de souches STEC O157 (*stx*+, *eae*+) dans du haché de bœuf prélevé en grande surface montre que des souches pathogènes se retrouvent au stade de la distribution (filet américain) et constituent un danger direct pour les consommateurs.

Si on considère les caractéristiques des souches, on constate que le sérotype le plus fréquent est le sérotype O157:H7 (83/96 soit 86, 4 %) et le pathotype le plus fréquent : *eae stx<sub>2</sub> ehxA* (75/96 soit 78 %) qui est le pathotype le plus dangereux chez l'homme car le plus souvent associé à des épidémies.