

**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 II. Etude de la prévalence des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines dans les viandes hachées en Belgique.

Assessment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contamination in Belgian beef minced meat

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

Third conference on food microbiology, septembre 1998, Liège, Belgique.

Lauréate du BioMérieux Award 1998.

I. Justification de l'étude

En 1994, le centre de référence belge (UZ-Brussel) a diagnostiqué 29 cas sporadiques d'infection liée aux STEC (EHEC) dans le cadre du réseau de surveillance des maladies infectieuses. Sur les 11 souches vérocytotoxinogènes sérotypées à cette date, 6 étaient du sérotype O157:H7 et 4 du sérotype O26 (ISP, 1994).

Ce dernier sérotype a fréquemment été retrouvé chez les animaux domestiques en Belgique tandis que dans les pays anglo-saxons, le sérotype O157:H7 est retrouvé dans les élevages de bovins qui sont considérés comme les principaux réservoirs des souches STEC (Pohl et al, 1997). Une autre étude, menée par le centre de référence à partir de coprocultures hospitalières a permis de mettre en évidence une prévalence de 1 % de souches STEC et de 0,2 % de souches STEC de sérotype O157:H7. Les souches O157:H7 isolées dans ces deux contextes appartiennent à de nombreux lysotypes différents, excluant de ce fait l'existence de souches épidémiques (Piérard, 1990).

L'étude I, décrite dans ce document a permis de mettre en évidence la présence d'une souche *d'E. coli* O157:H- pathogène à partir d'écouvillons de carcasses de bovins ce qui confirme l'existence de ces souches en Belgique et n'écarte pas le risque de voir apparaître des cas d'infections humaines voire d'épidémies à partir d'aliments. Ceci est d'autant plus justifié par les habitudes culinaires dans un pays où la viande de bœuf y est très souvent consommée crue ou légèrement cuite. Il devenait donc important à cette époque de surveiller l'émergence de ce type de souche en Belgique afin de pouvoir appliquer les mesures prophylactiques adéquates en temps opportuns. La viande hachée de bœuf représente le risque majeur d'infections à STEC. Elle fut la principale cible pour une épidémi-surveillance de ces agents pathogènes (IEV, 1997).

II. Plans d'échantillonnage et méthodologie de recherche des STEC.

1. Échantillonnage

Le plan d'échantillonnage proposé visait à l'analyse de 627 échantillons de viandes hachées pendant une année en 1997. Les échantillons ont été prélevés au niveau de quatre grandes entreprises productrices d'une forte proportion des viandes hachées consommées en Belgique. Ces entreprises ont été surveillées systématiquement avec identification de la provenance des viandes (abattoir et, si possible, élevage) afin de pouvoir détecter la source de contamination. L'ensemble, des souches *d'E. coli* O157 isolées, devait être envoyé aux laboratoires de référence (UZ-Brussel) pour une caractérisation complète.

Dans le cas où des échantillons auraient permis l'isolement des souches de STEC de sérotype O157:H7, une enquête approfondie aurait été menée, conjointement par l'Institut d'Expertise Vétérinaire et le Ministère de l'Agriculture, afin d'éviter, dans la mesure du possible, la dissémination de la souche pathogène.

2. Méthodologie de recherche des STEC O157 et autres STEC

La procédure analytique a consisté d'une part, en la recherche de la présence de souches d'*E. coli* portant l'antigène O157 et confirmation de leur virulence, et, d'autre part, en la détection des autres sérotypes de STEC par la technique d'hybridation ADN/ADN sur colonies et par PCR (recherche et confirmation des gènes de virulence).

Les analyses ont été effectuées au niveau des laboratoires de l'Université de Liège (ULg) et de l'Université de Gand (UGent).

2.1. Recherche de la présence de souches portant l'antigène O157 (figure II.1)

La recherche des *E. coli* O157 a consisté en la préparation d'une suspension mère à partir de 25 g de viande hachée dans 225 ml d'eau peptonnée tamponnée stérile (EPT, Oxoid).

Après une incubation de 7 heures à 37°C sous agitation, une étape d'immuno-séparation magnétique (IMS, DynabeadsTM anti *E. coli* O157) est réalisée à partir d'un millilitre de suspension-mère. Après 8 heures d'incubation, un isolement sur une gélose Mac Conkey au sorbitol (SMAC) est effectué à partir de la suspension-mère. Les colonies qui se sont développées sur cette gélose ont servi à la réalisation de la PCR. Cinquante microlitres (50 µl) du concentrat (billes magnétiques et bactéries) obtenus après IMS sont étalés sur la gélose Mac Conkey au sorbitol et incubés 24 h à 42°C et 50 autres µl sont ajoutés au bouillon mEC + novobiocine et incubés 17 h à 37°C pour la réalisation du test immuno-enzymatique (VIDASTM ECO ou EHEC-TEKTM) au départ du milieu liquide.

Les colonies isolées sur gélose SMAC sont testées par agglutination au latex anti-O157 (Dry-spot *E. coli* O157, Oxoid). La caractérisation biochimique des souches O157 est réalisée sur galerie Api 20 E. Les souches d'*E. coli* O157 isolées sont envoyées au laboratoire de référence pour confirmation de la présence des gènes de virulence par PCR (UZ-Brussel).

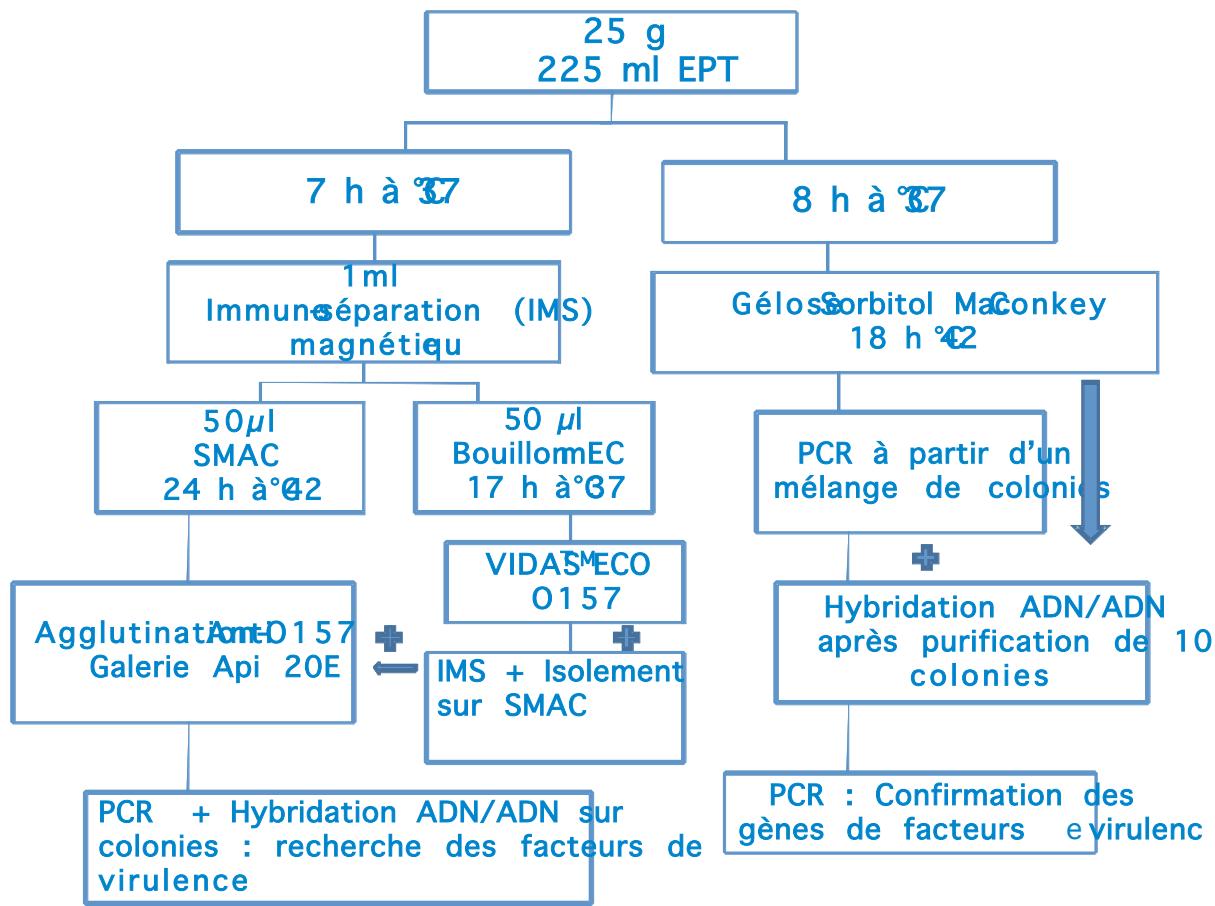


Figure II.1. Schéma d'isolement et de caractérisation des souches

2.2. Recherche des gènes codant pour les vérocytotoxines par PCR

La PCR a été réalisée à partir des colonies *d'E.coli* de sérotype O157 et des colonies prélevées dans la masse de l'isolement sur gélose SMAC incubée 24 heures à 42°C (figure II.1).

2.2.1 Réalisation de la PCR

Les colonies prélevées ainsi que des souches témoins (une souche possédant le gène recherché, ATCC43888 pour la recherche du gène *eae* ou 193 pour le recherche du gène *stx*, et une souche HB 101 ne possédant aucun des gènes recherchés) sont mises en suspension dans 50 µl d'eau distillée stérile.

Après lyse de la paroi bactérienne à 100°C pendant 10 minutes et centrifugation 30 secondes à 4500 tr/mn, 5 microlitres de surnageant sont récupérés dans un tube Eppendorf et soumis à la réaction PCR.

Cinq microlitres de tampon (Tris-HCL pH 8,8), 5 µl de dNTP (désoxyribonucléotides 2mM), 1 µl de chaque amorce (tableau II.1), 33 µl d'eau distillée et 1 µl d'enzyme (Dynazyme, 2UI/ µl) sont ajoutés à l'ADN à tester, centrifugés pendant 5 secondes à 4500 tr/mn et soumis aux conditions de PCR définies dans le tableau II.2

	<i>"Amorces pour la détection du gène eae (CHINA at al., 1995)</i>		<i>Amorces pour la détection du gène stx. (PIERARD et al., 1997a)</i>	
<i>Nom</i>	<i>INTu</i> (intimine upper)	<i>INTl</i> (intimine lower)	<i>VTu</i> (VT upper)	<i>VTl</i> (VT lower)
<i>Séquences</i>	AGGCTTCGTC ACAGTTG	CCATCGTCAC CACAGGA	GTTATCCATG GAACTA	CATAGGTATC CAGTTC

Tableau II.1. Amorces utilisées pour la recherche des facteurs de virulence

2.2.2. Conditions de PCR

	<i>eae</i>	<i>VT</i>
<i>Début de cycle</i>	94°C, 5mn	94°C, 5mn
<i>Dénaturation</i>	94°C, 1mn	94°C, 90s
<i>Hybridation</i>	55°C, 1mn	43°C, 60s
<i>Polymérisation</i>	72°C, 2mn	72°C, 60s

Tableau II.2. Conditions de PCR

2.2.3. Détection des produits d'amplification

Après préparation d'un gel d'agarose à puits calibrés (2,5 % en tampon TAE), 10 µl de produits d'amplification et 2 µl de bleu de bromophénol (indicateur de migration) sont ajoutés dans chacun des puits. Un des puits est réservé au marqueur de taille (multiples de 123 pb). Après migration (électrophorèse anodique sous tampon TAE), coloration par du bromure d'éthidium pendant 10 à 40 mn et rinçage à l'eau distillée, les fragments d'ADN sont visualisés par transillumination ultra-violette (303nm)

Une souche obtenant le même profil que celui de la souche témoin positif est considérée comme porteuse du gène recherché. La présence des gènes de virulence est confirmée par hybridation ADN/ADN sur colonies.

2.3. Caractérisation des souches isolées par hybridation ADN/ADN sur colonies

L'hybridation ADN-ADN sur colonies a été appliquée aux souches d'*E.coli* O157 isolées et aux souches purifiées après résultats positifs avec la PCR (figure II.1). Dix colonies isolées sur milieu Mac Conkey au sorbitol ont été repiquées en double sur milieu Luria-Bertani (LB) selon une matrice quadrillée standardisée (matrice allant de 1 à 50 et de C1 à C7).

Chaque emplacement correspond à une souche différente. Les emplacements C1 à C6 ont été réservés aux souches de référence témoins (tableau II.3). Les milieux LB ensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 heures.

Témoins	Sérotypes	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
<i>C1 : 1987</i>		-	+	-
<i>C2 : 625</i>		+	+	-
<i>C3 : 193</i>	O26	+	+	-
<i>C4 : ATCC43888</i>	O157:H7	+	-	-
<i>C5 : 211</i>	Rough : H7	-	-	+
<i>C6: HB101</i>	K12	-	-	-
<i>C7 néant</i>				

Tableau II.3 : Caractéristiques des souches témoins utilisées

2.3.1 Préparation des filtres

La préparation des filtres a été réalisée par transfert des colonies repiquées sur papier-filtre Wathman 541 après mise en contact durant 2 heures. Les filtres transférés dans une cuve sont traités par immersion dans du SDS 10 % pendant 3 min pour la lyse de la paroi bactérienne, dans du NaOH 0,5 M pour la lyse complète de la bactéries, la dénaturation de l'ADN et fixation sur le filtre pendant 15 mn puis dans du TRIS-HCl 0,5 M/NaCl 1M (neutralisation du NaOH) pendant 2 fois 5 min. Les filtres sont séchés à l'air libre.

2.3.2. Préparation des sondes génétiques

Les sondes génétiques ont été préparées après purification de plasmides recombinants portant les différents différents gènes recherchés sur résine échangeuse d'ions (Qiagen Plasmid Kit) et digestion par des endonucléases de restriction appropriées. La séparation des fragments est obtenue par

électrophorèse anodique en gel d'agarose. Après élution (Gene-Clean, BIO 100), les fragments sondes sont lyophilisés et conservés à - 20°C.

Fragment-sonde	Plasmide	Enzyme de restriction	Taille (pb)	Références
<i>Eae</i>	PCDV434	<i>Sal1-KpnI</i>	1000	Jerse et al, 1990
<i>Stx₁</i>	PJN37-19	<i>BamH1</i>	1142	Newland et al, 1988
<i>Stx₂</i>	PNN11-19	<i>PstI</i>	842	Newland et al, 1988

Tableau II.4 : Caractéristiques des sondes génétiques utilisées.

2.3.3. Marquage des sondes génétiques

Après réhydratation des sondes dans 12 µl d'eau distillée stérile, l'ADN est dénaturé par chauffage 4 min à 100°C puis refroidi dans de la glace fondante. Les sondes sont marquées à l'aide du kit Ready to go DNA labelling (Amersham) en présence de dCTP³² et purifiées par chromatographie d'exclusion sur colonne (Sephadex G50).

2.3.4. Hybridation des filtres

Pour le calcul du volume de sonde marquée à utiliser, 1 µl de sonde marquée est déposé sur un papier buvard et séché à l'air libre. L'activité spécifique est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (CPM/µl). Dans un récipient, 30 ml de solution d'hybridation (SSC 6X, Lait gloria 10 mg/ml, SDS 1 %, Calf Thymus DNA 20 µg/ml) sont ajoutés. Les filtres sont pré-hybridés 1 h à 65°C. Un volume de sonde marquée de manière à avoir 400 000 CPM/µl est ajouté à la solution de pré-hybridation. L'ensemble est incubé à 65°C sous agitation pendant une nuit.

2.3.5. Lavages des filtres

Après élimination de la solution d'hybridation, une solution de lavage (Solution saline concentrée (SSC) 6X, SDS 1%) est ajoutée jusqu'à couverture complète des filtres et incubée 30 min à 65°C sous agitation. La solution de lavage est éliminée. Cette étape est répétée 3 fois. Les filtres sont séchés à l'air libre.

2.3.6. Autoradiographie

Dans une cassette métallique, les filtres sont mis en contact, avec une plaque radiographique pendant 24 à 48 h à -70°C. Après développement et lecture de la plaque, un noircissement indique un résultat positif (présence du gène recherché) tandis qu'une absence de noircissement indique un résultat négatif (absence du gène recherché).

3. Dénombrement des *E. coli* totaux

Le dénombrement des *E. coli* a été effectué sur 299 échantillons de viandes hachées analysés au niveau du laboratoire de l'ULg. Un millilitre de la suspension-mère et 1 ml d'une dilution au dixième de celle-ci ont été ensemencés en profondeur sur un milieu sélectif chromogène (gélose PTX, Merck), selon la méthode décrite par l'AFNOR (NF-V08-053). Après homogénéisation et solidification, une deuxième couche (5 ml) a été ajoutée. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 44°C pendant 24 heures. Les colonies bleues, caractéristiques des *E. coli* β -glucuronidase positives ont été dénombrées.

III. Résultats

1. Dénombrements des *Escherichia coli* totaux

Le tableau II.5 montre les résultats du dénombrement d'*E. coli* par gramme d'échantillons. Les critères légaux (arrêté royal du 4 juillet 1996) concernant les viandes hachées sont les suivants:

- $m = 50$ ufc/g (seuil limite au-dessous duquel tous les résultats sont considérés comme satisfaisants. La valeur de $3m$ est prise comme limite pour tenir des variabilités liées à la méthode analytique)
- $M = 500$ ufc/g (seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants)
- $n = 5$ (n est le nombre d'unités qui composent l'échantillon)
- $c = 1$ (nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs entre m et M).

<i>Classes (ufc/g)</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Proportion</i>
<10	151	50, 5 %
11-150	100	33, 4 %
151-500	23	7, 7 %
>500	25	8, 4 %
Total	299	100 %

La moyenne et l'écart - type ont été calculés en prenant les résultats «<10cfu/g» égaux à 10 ufc/g.

La moyenne est égale à 1,47 log ufc/g et l'écart type de 0,71 log ufc/g.

Tableau II.5 : Résultats des dénombremens d'*E. coli* β -glucuronidase positifs à 44°C.

2. Prévalence d'*E. coli* O157 isolés à partir des viandes hachées

A partir des 311 prélèvements de viandes hachées traités à l'ULg, l'antigène O157 a été détecté dans 5 échantillons après réaction immuno-enzymatique (VIDASTM O157) soit une prévalence de 1,6 %.

Deux souches *d'E. coli* O157 non pathogènes (*stx-* et *eae-*) seulement ont été isolées sur milieu Mac Conkey au sorbitol à partir du total des 627 échantillons analysés dans les deux laboratoires.

3. Prévalences des autres STEC/AEEC

3.1. Prévalence d'échantillons positifs par PCR

Quarante-cinq échantillons (7,2 %) se sont révélés positifs par PCR (*eae* et/ou *stx*). La PCR a permis de mettre en évidence la présence des gènes *stx* dans 32 échantillons (5,1 %) dont 5 (0,8 %) étaient *stx+* et *eae+* et 27 (4,3 %) étaient *stx+* *eae-*. Le gène *eae*, codant pour l'intimine, a été retrouvé seul dans 13 échantillons soit une prévalence de 2,1 % (tableau II.6).

	<i>Essais</i>	<i>stx+et eae+</i>	<i>stx+ et eae-</i>	<i>stx- et eae+</i>	<i>stx- et eae-</i>
<i>Nombre</i>	627	5	27	13	582
<i>Pourcentage</i>	100	0,8	4,3	2,1	92,7

Tableau II.6. Résultats de PCR à partir du mélange des colonies présentes sur gélose SMAC

3.2. Isolement et caractérisation des souches par hybridation ADN/ADN sur colonies.

Après purification de 10 colonies isolées à partir de chacun des 45 échantillons positifs en PCR et après hybridation ADN/ADN sur colonies, seules 7 souches possédant seulement l'un des gènes de virulence ont été mises en évidence. Aucune souche portant les deux gènes *stx* et *eae* n'a été confirmée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.7.

<i>Pathotypes</i>					
	<i>stx₂</i>	<i>stx₁</i>	<i>eae</i>	<i>Hybridation</i>	<i>Total</i>
	<i>négative</i>				
<i>Nombre</i>	1	4	2	38	45
<i>Pourcentage</i>	2,2 %	8,9 %	4,4 %	84,4 %	100%

Tableau II.7 : Résultats des hybridations et pathotypes isolés

3.3. Résultats individuels des échantillons positifs après PCR et caractérisation des souches

Les souches *d'E. coli* (n=7) isolées après hybridation ADN/ADN sur colonies possédant au moins un des facteurs de virulence ont été caractérisées au niveau du laboratoire de référence (UZ-Brussel). Les résultats (facteurs de virulence, sérotypes) sont présentés dans le tableau II.8.

Référence interne des souches	PCR		Hybridation et sérotypes			
	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>Stx₁</i>	<i>stx₂</i>	<i>Eae</i>	Serotype
96/101/1	+	-	+	-	-	Indéterminé
96/184/2	+	-	+	-	-	Indéterminé
96/189/35	+	-	-	+	-	O91
97/57/1	+	-	+	-	-	Indéterminé
97/22/13	+	-	-	+	-	O91
97/22/9	-	+	-	-	+	O128
97/22/12	-	+	-	-	+	O128

Tableau n° II.8. Confirmation et caractérisation des souches *stx* et/ou *eae* positives et détermination du sérotype

IV. Conclusion

Le choix de la taille de l'échantillon a été effectué conformément à la norme ISO 2859-1 (ISO, 1999). La taille de l'échantillon a été choisie dans le but d'avoir 99 chances sur 100 de détecter un taux réel de contamination de 1 % des unités. L'objectif étant d'isoler le maximum de souches afin de pouvoir apprécier l'étendue du problème. Statistiquement ce nombre permet un meilleur pouvoir de détection car un échantillon de 25 g de viande hachée peut regrouper de la viande issue de plusieurs carcasses ou peut avoir subi une contamination croisée à tous les stades de sa production (activités d'abattage, de transport, de découpe ou de hachage).

En ce qui concerne l'évaluation de la qualité bactériologique des viandes hachées consommées en Belgique à partir des résultats des dénombrements des *E. coli* totaux, celle ci est satisfaisante. Plus de 80 % des échantillons avaient un taux inférieur à 150 ufc par gramme donc inférieur au critère légal ($m = 50$ ufc/g, $M = 500$ ufc/g, $n = 5$ et $c = 1$). Les méthodes de laboratoire mises en œuvre dans cette étude pour la recherche des STEC O157 étaient toutes basées dans un premier temps sur les propriétés particulières de ces souches c'est à dire l'absence de fermentation du sorbitol, le caractère β -glucuronidase négatif et la présence de l'antigène somatique O157. Ces techniques ne permettent pas de détecter les souches d'EHEC O157:H- sorbitol positif et β -glucuronidase positive qui sont prédominantes en Europe centrale. De plus, la détection, basée uniquement sur la présence de l'antigène O157 demande une confirmation car d'une part, d'autres espèces bactériennes peuvent présenter des réactions croisées avec l'antigène O157 et d'autre part, des souches d'*E. coli* O157 peuvent ne pas posséder les facteurs de virulence caractéristiques des EHEC.

Aucune souche potentiellement pathogène (*eae*+ *stx*+) de STEC O157 n'a été isolée au cours de cette étude. Les mêmes résultats ont été obtenus au cours d'une étude préliminaire en Belgique à partir de

2440 échantillons de viandes de plusieurs espèces animales (Piérard, 1997 b). De plus même si le risque de contamination par les denrées alimentaires semblait faible en cette période, il n'était pas exclu de voir apparaître une épidémie comme ce fut le cas en Suède où une faible incidence de cas de STEC était enregistrée (Ziese et al, 1996). En ce qui concerne les STEC non O157, la PCR a permis de détecter 32 échantillons positifs pour les gènes *stx* recherchés. Le problème réside dans la capacité à isoler la souche compte tenu de l'absence de caractéristiques phénotypiques particulières par rapport aux autres *E. coli*. L'hybridation ADN/ADN sur colonies n'a permis d'isoler des STEC (*stx*+, *eae*-) que dans 5 cas sur 45 soit 11,1 %. Deux souches étaient des EPEC (*eae* + *stx*-) et aucune souche isolée n'était *eae* + *stx* +.

Les EPEC peuvent causer des diarrhées chez l'homme.

Le développement des méthodes d'isolement pour les STEC non O157 est nécessaire.