

**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

PARTIE EXPERIMENTALE

I. EN BELGIQUE

Etude I. Evaluation du taux de contamination par les STEC de sérotype O157 de carcasses de bœuf et de porcs dans 9 abattoirs

An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs

KORSAK, N., DAUBE G., GHAFIR Y., CHAHED A., S. JOLLY S., VINDEVOGEL H.

Journal of Food Protection, 1998, 61, 535-541.

I. Justification de l'étude

Cette étude s'inscrit en 1996 dans le contexte de l'application de la directive 93/43/CEE (Anonyme, 1993) de la Communauté Européenne et des principes du système HACCP en industrie agroalimentaire. L'application du système HACCP dans le secteur de production des produits carnés a pour objectif d'identifier tous les dangers y compris les dangers microbiologiques le long des étapes de production afin de les éliminer ou de les réduire au minimum.

Cette étude, réalisée au niveau de neuf abattoirs en Belgique devait permettre d'évaluer le taux de contamination par des agents bactériens zoonotiques des carcasses de bœuf et de porc produites en Belgique. Ces bactéries pathogènes pour l'homme (*Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp* et *Escherichia coli* de sérotype O157) sont impliquées dans la majorité des cas de toxi-infections d'origine alimentaire.

Les STEC O157 présents dans le tube digestif des animaux de boucherie et particulièrement des bovins en bonne santé peuvent se retrouver au niveau de la carcasse et des viandes notamment lorsque les procédés d'abattage (dépouillement et éviscération) et les règles d'hygiène ne sont pas respectées.

Par ailleurs, cette étude a standardisé la méthode d'échantillonnage par écouvillonnage des surfaces de carcasses au niveau de sites spécifiques pour chaque espèce.

Cette méthode permet de plus d'évaluer le niveau de contamination des carcasses par des indicateurs de la qualité microbiologique et, par conséquent, le niveau d'hygiène de la production. En cas de dépassement des critères microbiologiques requis, des mesures correctives peuvent être mises en place.

II. Matériel et méthodes

1. Lieux et périodes de prélèvements.

Les prélèvements testés provenaient de 5 abattoirs de bœuf et quatre abattoirs de porcs dont la production est représentative de la production en Belgique. Les demi-carcasses ont été écouvillonnées 2 à 4 heures après abattage juste après l'étape de refroidissement rapide pendant la période comprise entre janvier à mars de l'année 1996. Les prélèvements ont été effectués par le même opérateur au niveau des neuf abattoirs.

2. Matrices analysées et nombre de prélèvements effectués

Trois cent dix demi-carcasses de bœuf et 245 demi-carcasses de porcs ont été écouvillonnées pour la recherche des *E. coli* O157. Le nombre de carcasses échantillonnées par abattoir est indiqué ci-dessous (tableau I.1).

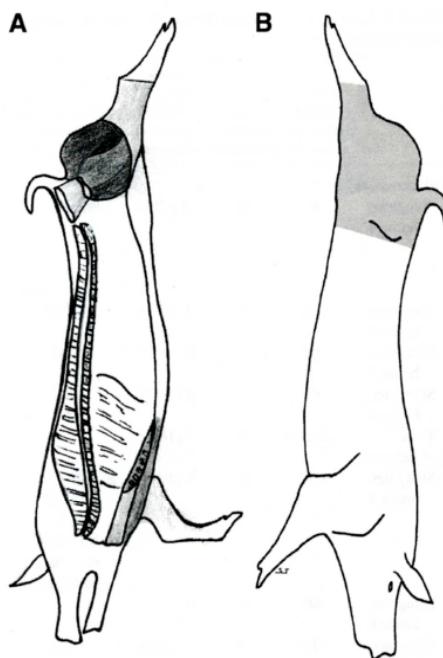
<i>Carcasses de porc</i>	<i>Nombre de carcasses échantillonnées</i>
<i>Abattoir n°1</i>	80
<i>Abattoir n°2</i>	60
<i>Abattoir n°3</i>	60
<i>Abattoir n°4</i>	45
<i>Total</i>	245

<i>Carcasses de bœuf</i>	<i>Nombre de carcasses échantillonnées</i>
<i>Abattoir n°5</i>	120
<i>Abattoir n°6</i>	60
<i>Abattoir n°7</i>	45
<i>Abattoir n°8</i>	40
<i>Abattoir n°9</i>	45
<i>Total</i>	310

Tableau I.1. Nombre de prélèvements effectués par abattoir

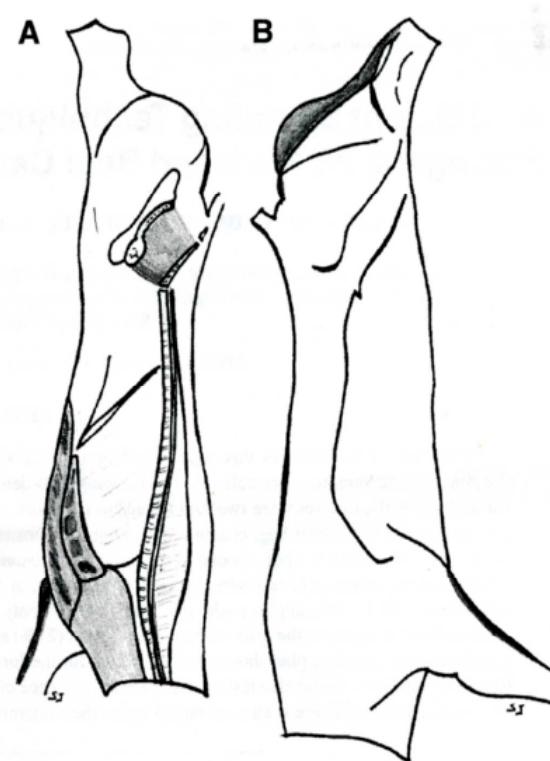
3. Méthodes d'échantillonnage par écouvillonnage des surfaces de carcasses

Quatre zones ont été écouvillonnées par la technique du double écouvillonage selon le schéma de contrôle adapté de l'USDA (United States Department of Agriculture). Les zones écouvillonnées pour chaque espèce sont représentées comme suit (figures I.1 et I.2): Une surface de 1200 cm² a été écouvillonnée sur les carcasses de porcs et une surface de 1500 cm² sur les carcasses de bœuf. Les écouvillonnages ont été effectués à l'aide d'une pince stérile et de gazes stériles. Les écouvillons de 5 carcasses regroupés dans un même sac stomacher et constituant un échantillon ont été effectués par un même opérateur pour tous les échantillons



Les zones en sombre sont celles qui ont été écouvillonnées

Figure I.1. Zones de prélèvement chez le porc



Les zones en sombre sont celles qui ont été écouvillonnées

Figure 1.2. Zones de prélèvement chez le bovin

4. Méthodes de recherche des *E. coli* O157 (figure I.3)

Les écouvillons réalisés sur 5 demi-carcasses dans un même abattoir le même jour constituant un échantillon sont soumis à un pré-enrichissement dans 100 ml de BPW (Buffered Peptone Water Oxoid CM509B, UK). Un millilitre (1 ml) de la suspension mère est soumis après 7 h d'incubation à 37°C à un enrichissement immuno-magnétique (IMS, Dynabeads™ anti *E. coli* O157). Pour ce faire, cinquante microlitres du concentrat billes + bactéries sont ensemencés sur des géloses Mac Conkey au sorbitol (SMAC, Unipath) et 50 microlitres sur des membranes «Pétri film kit» (laboratoires, 3M Santé, Malakoff, France) et incubés à 42°C pendant 18 heures. Cent microlitres de la suspension mère (après incubation 18 h à 37°C) chauffés pendant 10 minutes à 100°C sont soumis à une réaction immuno-enzymatique par la méthode VIDAS ECO O157 (Bio Mérieux, France). Lors de résultat positif au VIDAS ECO O157, au moins cinq colonies sorbitol négatives et une colonie sorbitol positive isolées à partir du milieu SMAC sont testées au latex anti O157 (Oxoid).

La caractérisation biochimique est réalisée sur galerie API 20E (BioMérieux) et sur gélose Rapid *E. coli* (Sanofi, Diagnostic Pasteur, Paris, France) pour la recherche de l'activité β glucuronidase. Les gènes de virulence des souches d'*E. coli* O157 isolées ont été mis en évidence au niveau du laboratoire de référence belge par amplification des gènes *eae*, *stx₁* et *stx₂* et production de l'entérohémolysine (Dr Piérard, UZ-Brussel)

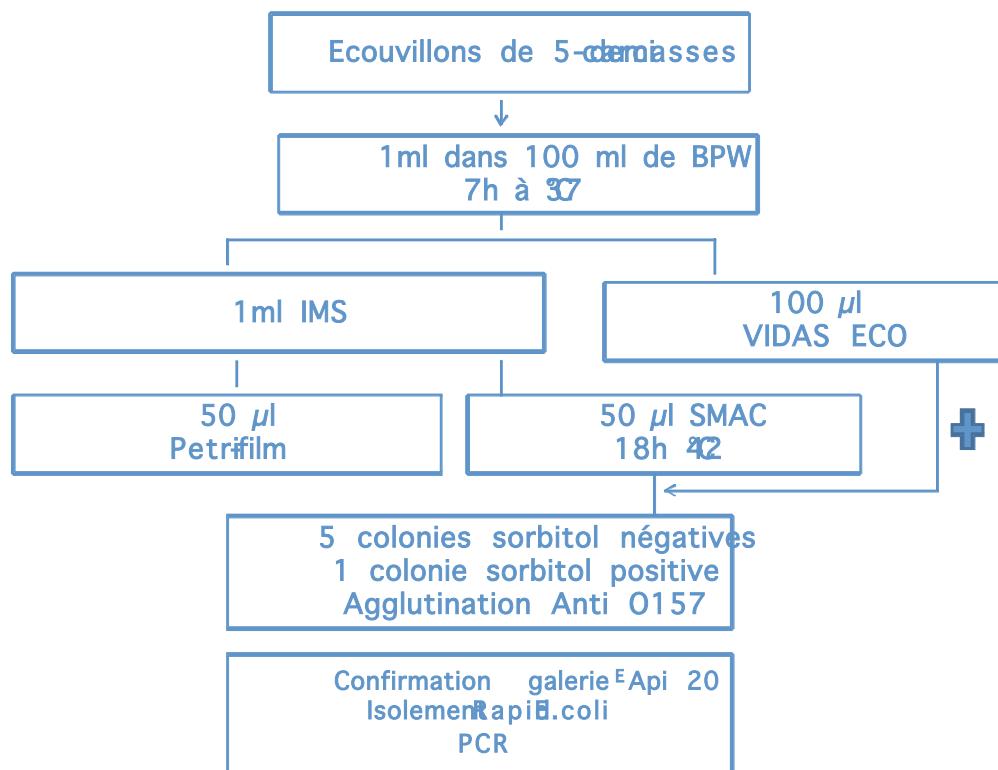


Figure I.3. Méthodes de recherche des STEC O157.

III. Résultats

L'antigène O157 a été détecté par la méthode VIDAS ECO dans 7 des échantillons de carcasses de porcs soit une prévalence de 14 % et dans 3 échantillons de carcasses de bœuf soit 5 %. Seules, trois souches ont pu être isolées à partir de ces 10 échantillons positifs. Deux provenaient de carcasses de porcs et l'autre souche d'un échantillon de carcasses de bœuf soit une prévalence de 1,6 % dans cette espèce. Les résultats présentés dans le tableau I.2 montrent que deux souches d'*E. coli* O157 *stx*-, *eae*- ont été isolées à partir d'écouvillons de carcasses de porcs produites dans un même abattoir (abattoir n°1) et une souche d'*E. coli* O157:H- possédant les gènes *stx*₁, *stx*₂ et *eae*, positive pour la production de l'entérohémolysine, a été isolée à partir d'un échantillon issu de l'abattoir de bovins (abattoir n°5). Au total, sur les 10 échantillons positifs à l'immuno-essai, seule une souche d'*E. coli* O157 potentiellement pathogène (STEC O157) a pu être isolée.

Abattoir	carcasses de porc (n)	Echantillons analysés (n)	Echantillons positifs au VIDAS O157	Souches <i>E. coli</i> Isolées
<i>Abattoir n°1</i>	80	16	2 (12 %)	2 <i>E. coli</i> O157:H ^(a)
<i>Abattoir n°2</i>	60	12	2 (17 %)	NI
<i>Abattoir n°3</i>	60	12	0	NA
<i>Abattoir n°4</i>	45	9	3 (33 %)	NI
Total	245	49	7 (14 %)	2 (4 %)
Abattoir	Carcasses de bovin (n)	Echantillons (n)	Echantillons positifs au VIDAS O157	Souches isolées
<i>Abattoir n° 5</i>	120	24	1 (4 %)	1 STEC O157:H- ^(b)
<i>Abattoir n° 6</i>	60	12	0	NA
<i>Abattoir n°7</i>	45	9	1 (11 %)	NI
<i>Abattoir n°8</i>	40	8	0	NA
<i>Abattoir n°9</i>	45	9	1(11 %)	NI
Total	310	62	3 (5 %)	1 (1,6 %)

(a): Deux souches de *E. coli* O157:H-; négatives pour les gènes *stx*₁, *stx*₂ et *eae*; possédant une activité β -glucuronidase; fermentant le sorbitol; négatives pour la production d'entérohémolysine.

(b): Une souche d'*E. coli* O157:H-; *stx*₁ et *stx*₂ +; *eae* +; *ehxA* +; ne possédant pas d'activité β -glucuronidase et ne fermentant pas le sorbitol. NI: souches non isolées, NA: non applicable

Tableau I.2. Prévalences des *E. coli* O157 et caractéristiques des souches isolées

IV. Conclusions

L'implémentation progressive du système HACCP dans les industries alimentaires à partir des années nonante a amené les professionnels du secteur à adopter des démarches communes pour pouvoir identifier, évaluer et minimiser les dangers lors de la production.

En ce qui concerne le secteur de la viande, il était important de tester une méthode qui permette d'évaluer la qualité hygiénique des surfaces de carcasses en relation avec les bonnes pratiques de fabrication et de production. Dans le cas de déviations aux points critiques, des mesures correctives sont entreprises pour diminuer au minimum la contamination par le danger identifié.

Différentes méthodes à différents niveaux (réception, boucher, industrie) ont été proposées pour évaluer la qualité microbiologique des produits carnés. La méthode adoptée au cours de cette étude est la méthode non destructive qui consiste en un écouvillonnage de la surface de carcasses au niveau de quatre sites considérés comme les plus représentatifs de la contamination microbienne. En effet, il était important de mettre en place un système uniforme d'appréciation de la qualité bactériologique des carcasses au niveau de tous les abattoirs.

L'avantage de regrouper 5 demi-carcasses dans un même échantillon est de tester un grand nombre de carcasses à moindre coût. Cependant les prévalences obtenues par cette méthode ne sont qu'approximatives puisque 1 échantillon regroupe les écouvillons de plusieurs demi-carcasses.

En ce qui concerne la recherche des STEC O157, les prévalences estimées (1 à 5 % pour les carcasses de bœuf) ne sont qu'approximatives à cause du regroupement de 5 carcasses pour une analyse. Cette étude a permis pour la première fois à partir de denrées alimentaires en Belgique d'isoler une souche STEC O157 H- (sorbitol-, β -glucuronidase -) possédant les principaux caractères de virulence (*stx₁* +; *stx₂* +; *eae* +). Dès confirmation de la présence des gènes de virulence par le laboratoire national de référence (UZ-Brussel), une enquête a été menée dans la ferme d'origine des animaux trouvés positifs grâce à l'efficacité du système de traçabilité des animaux SANITEL mis en place en Belgique. Ce système permet de remonter à l'origine d'un animal et de le suivre dans son itinéraire de la ferme à l'abattoir. Les matières fécales (12 pools de cinquante échantillons) des animaux du troupeau ont été analysées dans le but de détecter un portage des souches STEC O157.

Malgré la rapidité des tests (7 heures après confirmation de la virulence de la souche isolée), aucun STEC O157 n'a été détecté par la méthode VIDAS après une nuit de pré-enrichissement dans du BPW. Il est possible que la durée du pré-enrichissement ait été trop longue ou non adaptée car peu sélective ou que l'animal ait été contaminé soit au cours du transport soit à l'abattoir au cours des opérations d'abattage par le matériel. Néanmoins, cette étude a révélé la présence d'une souche d'*E. coli* O157:H- potentiellement pathogène pour l'homme dans les denrées alimentaires pour la première fois en Belgique.