

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

| | |
|--------------------------------------|--|
| Orientation: | Médecine vétérinaire |
| Titre de la thèse en français | Prévalence et caractérisation de souches d' <i>Escherichia coli</i> O157 producteurs de shigatoxines isolées de denrées alimentaires d'origine animale en Belgique et en Algérie |
| Titre de la thèse en anglais | Prevalence and characterization of O157 shigatoxin producing <i>Escherichia coli</i> isolated from foodstuffs from animal origin in Belgium and Algeria |
| Candidat : | Amina CHAHED |
| Promoteur : | Professeur Georges DAUBE |
| Département et Service : | Département des Sciences des Denrées alimentaires, Service de Microbiologie alimentaire, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique |
| Date de la défense publique : | 5 septembre 2007 |
| Composition du jury | <i>Membres du comité de thèse :</i> Professeur G. Daube, Professeur J. Mainil, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique Professeur D. Piérard, UZ-Brussel, Vrije Universiteit Brussel, Belgique. <i>Membres extérieurs à la faculté :</i> Professeur P. Demol, Université de Liège, Belgique. Professeur C. Vernozy-Rozand, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, France. <i>Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :</i> Professeur A. Clinquart, Professeur F. Rollin, Professeur E. Thiry, Professeur A. Vanderplasschen, Docteur A. Linden. |

DESCRIPTION DU SUJET ABORDÉ

Certains *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) ou *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxoinfections d'origine alimentaire qui se traduisent par des diarrhées mais aussi par des syndromes plus graves pour l'homme comme le syndrome hémolytique urémique pouvant provoquer la mort. Ils apparaissent comme un problème important de santé publique. La souche de STEC du sérotype O157:H7 est responsable d'épi-

démies dans le monde causant des milliers de malades et des dizaines de morts. Le réservoir principal est le bovin et les autres ruminants. Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) et leur environnement. Les facteurs de virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont principalement les protéines codées par un îlot

de pathogénicité, le LEE « *Locus of Enterocyte Effacement* », impliquées dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement et de la diarrhée et les toxines de Shiga codées par des bactériophages et impliquées dans les syndromes extra-intestinaux. À partir des années nonante, le nombre croissant d'épidémies liées à STEC, en Amérique du Nord et en Europe, ont interpellé les professionnels du secteur qui ont concentré leurs efforts pour mettre au point des moyens de recherche, d'identification, de maîtrise et de prévention du danger.

Le premier objectif de ce travail était donc d'approcher le plus précisément possible la situation en Belgique dans les principales filières de production de denrées alimentaires d'origine animale (DAOA). Pour ce faire, les études suivantes ont été entreprises : (i) une étude préliminaire de la contamination par les STEC O157 des carcasses de bœuf et de porc (étude I) ; (ii) une étude visant à la détermination du taux de contamination des viandes hachées de bœuf par les STEC O157 et autres sérotypes ; (iii) des études extensives basées sur des plans annuels de surveillance couvrant toute la production nationale visant à établir le taux de prévalence et l'évolution temporelle de la contamination par les STEC O157 dans les principales DAOA mais surtout dans la filière de la viande de bœuf. Les plans de recherche de ces pathogènes ont été couplés à la détermination du nombre d'*E. coli* totaux pour juger du niveau de maîtrise de la contamination fécale dans les établissements afin d'apporter des éléments quantitatifs pour une évaluation du risque lié aux STEC.

Le second objectif visait à déterminer le taux de contamination par les STEC et les STEC O157 dans deux abattoirs algériens, l'un de bœuf, l'autre de moutons afin de savoir si ces pathogènes posaient des problèmes de santé publique en Algérie. Le niveau de contamination fécale a aussi été étudié afin de juger de la maîtrise de l'hygiène de l'abattage.

RÉSULTATS

En Belgique

Evaluation du taux de contamination par les STEC de sérotype O157 de carcasses de bœuf et de porcs dans 9 abattoirs en 1996

Dans le cadre de l'implémentation

du système HACCP (directive 93/43/CE), trois cent dix carcasses de bœuf et 245 carcasses de porcs ont été soumises à un écouvillonnage en surface au niveau de sites spécifiques. La méthode de recherche était basée sur les étapes suivantes (i) un enrichissement non sélectif, (ii) une méthode de séparation immuno-magnétique, (iii) une détection immuno-enzymatique (VIDAS ECO, BioMérieux), (iv) un isolement sur milieu MacConkey au sorbitol. Cette étude a permis de standardiser la méthode d'échantillonnage et a révélé, pour la première fois en Belgique, la présence d'une souche STEC O157 :H- (*stx1+*, *stx2+*, *eae+*) potentiellement pathogène sur des carcasses bovines.

Prévalence des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines dans les viandes hachées en 1997

Aucune souche de STEC O157 (*eae stx*) n'a été isolée à partir des 627 échantillons de viande hachées analysées. La PCR a permis de détecter le gène *stx* dans 5,1 % des échantillons (n = 32). Seulement 7 souches ont été isolées par une méthode d'hybridation ADN/ADN sur colonies basée sur les principaux gènes des facteurs de virulence des STEC : deux *E. coli* de sérotype O91 (*stx2+*, *eae-*), deux *E. coli* entéro-pathogènes de sérotype O128 et trois de sérotypes non identifiés. La qualité bactériologique des viandes hachées testées était satisfaisante puisque plus de 80 % des échantillons avaient un taux d'*E. coli* inférieur à 50 unités formant colonies (ufc) par gramme donc au critère légal de m = 50 ufc/gramme (arrêté royal du 4 juillet 1996)

Surveillance du taux de contamination des denrées alimentaires d'origine animale par des souches

d'*Escherichia coli* du sérotype O157 de 1998 à 2004

Cette étude répond aux exigences des directives (92/117/CEE et 2003/99/CEE) et présente les plans de surveillance des STEC O157 dans les denrées alimentaires. Aucune souche de STEC O157 n'a été isolée à partir des 1025 échantillons (matrices issues de bovins, porcs, volailles, lapins) testés en 1997.

En 1998, une modification de la méthode analytique (méthode SP-VG M001) a permis d'isoler neuf souches d'*E. coli* de sérotype O157 (*stx+*) à partir de surfaces de 6010 carcasses regroupées en pools de 5 carcasses par échantillon. Quatre vingt pourcents des souches STEC O157 sont *stx2 eae* et *ehxA* et 90 % portaient l'antigène H7. Une majorité de firmes n'ont pas satisfait aux critères microbiologiques pour les *E. coli* (Ministère des Affaires sociales, de la Santé publique et de l'Environnement, 2002). Cependant, aucune relation statistiquement significative entre les niveaux de contamination par les *E. coli* totaux et la présence d'*E. coli* O157 n'a pu être établie.

Les années 1999 à 2004 ont été marquées par une surveillance des STEC O157 sur un plus grand nombre d'entreprises, un plus grand nombre d'échantillons (filière bovine, porcine, poulet, poule et poissons), une plus grande surface de carcasses écouvillonnées (décision 2001/471/CE) et des recherches au stade du consommateur. La méthode de recherche des STEC O157 a été la méthode SP-VG M001. Le dénombrement des *E. coli* a été réalisé selon la méthode validée par l'Association française de Normalisation (AFNOR), SDP-07/1-07/93. Des prévalences de STEC O157 égales à 1,3 % (n = 1984) en 1999, 0,4 % (n = 1501) en 2000, 1,08 %

(n = 1388) en 2001, 1,07 % (n = 1225) en 2002, 0,82 % (n = 1497) en 2003 et à 1,35 % (n = 1337) en 2004 ont été mises en évidence sur les surfaces de carcasses de bœuf, ce qui correspond à une moyenne pondérée de 0,95 %. En ce qui concerne les viandes hachées, la prévalence des STEC O157 est faible soit 0,1 % (1/974) en 1999, 0,4 % (1/487) en 2000, 1,68 % (5/298) en 2003 et aucun STEC O157 en 2001, 2002 et 2004 pour une moyenne pondérée de 0,27 %. La présence de souches dans du haché de bœuf prélevé en grandes surfaces montre que des souches pathogènes se retrouvent parfois au stade de la distribution.

Entre 1999 et 2004, deux souches STEC O157 ont été isolées en 2003 et deux autres en 2004 à partir de 764 viandes de découpe de bœuf analysées soit une prévalence de 0,52 %. Les matrices de porcs, de poules, poulets et de poissons ne semblent pas présenter un danger à l'heure actuelle puisque aucun STEC O157 n'y a été mis en évidence à ce jour en Belgique. Une amélioration de la contamination par les *Escherichia coli* a pu être observée au cours des années dans les firmes échantillonnées. Les 106 souches de STEC O157 isolées à partir des matrices de bovins sont en majorité des *E. coli* O157:H7, *stx2*, *eae* et *ehxA*, fréquemment impliqué dans les formes graves des infections.

En Algérie

Evaluation du taux de contamination des carcasses bovines par les Escherichia coli entérohémorragiques du sérotype O157 et d'autres Escherichia coli pathogènes

Une méthode simplifiée de la recherche des STEC O157 a permis de révéler la présence de 18 souches (7,8 %) STEC O157 à partir de 230 carcasses de bœuf échantillonnées. Septante

huit pourcents d'entre elles sont *stx2*, *eae* et *ehxA*. De même, 66 colonies possédant au moins un des gènes de virulence recherchés, ont été isolées à partir de trente carcasses positives à l'hybridation ADN/ADN sur colonies. Quarante (60,6 %) sont des *E. coli* entéro-pathogènes (*eae+*, *stx-*), 23 (34,8 %) sont (*stx+*, *eae-*) et trois (4,5 %) sont (*eae+*, *stx+*). Aucune des trois n'appartient aux sérotypes STEC les plus fréquents (O26, O111, O128, O103, O91, O145). Plus de 65 % des carcasses avaient des niveaux d'*E. coli* supérieurs à la limite d'acceptabilité (M) définie par le critère microbiologique belge (20 ufc/cm²).

Evaluation du taux de contamination par les Escherichia coli producteurs de shigatoxines sur les carcasses ovines et dans les matières fécales

Cette étude a permis de mettre en évidence, la présence de STEC O157:H7 sur 2,5 % des 160 carcasses écuvillonnées (décision 2001/471/CE). Le pathotype principal était *stx2 eae* et *ehxA*. Parmi les neuf souches STEC O157 *stx2* isolées et testées par PCR pour les sous-types c, d, e, f, seulement trois sont *stx2d*. L'étude du portage des STEC dans les matières fécales d'ovins a montré la présence du gène *stx* dans 25,4 % des prélèvements (n = 106). Le pathotype principal identifié sur un échantillon composite était *stx1* (50 %) suivi du pathotype *stx1*, *eae* (46,4 %). L'ovin est donc aussi un réservoir potentiel de STEC pathogènes et une source de contamination pour l'homme

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'existence de souches STEC O157 potentiellement pathogènes a été confirmée dans la filière bovine. La

prévalence de ces agents pathogènes observée sur les carcasses bovines en Belgique (en moyenne de 0,95 %) est proche des valeurs enregistrées dans d'autres pays : 0,7 % au Danemark (European Commission, 2001), 1 % en Tchécoslovaquie (Lukasova, 2004) et 1,4 % en Grande-Bretagne (Chapman, 2001). La prévalence des STEC O157 enregistrée en Algérie (7,8 % dans cette étude) est significativement supérieure aux prévalences observées en Belgique. Des prévalences du même ordre de grandeur ont été rapportées dans la littérature soit 17,1 % aux USA (Elder *et al.*, 2000), 12 % en Italie (Bonardi *et al.*, 2001), 11 % en Irlande (McEvoy *et al.*, 2003).

La prévalence des STEC O157 dans les viandes hachées est faible, en général inférieure à 1 %. Elle est de 0,27 % en Belgique (cette étude). De plus, la présence de souches dans du haché de bœuf prélevé en grandes surfaces a montré que des souches pathogènes se retrouvent parfois au stade de la distribution et constituent un danger direct pour le consommateur. Des résultats similaires ont été enregistrés 0,15 % en Angleterre (Chapman, 2001), 0,11 % en France (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003). Les matrices de porcs, de poules, poulets et de poissons ne semblent pas présenter un danger à l'heure actuelle puisque aucun STEC O157 n'y a été mis en évidence à ce jour en Belgique. Comme l'ont mentionné la plupart des études relatives à la prévalence des STEC O157, il est difficile de comparer les résultats obtenus à cause des différences constatées au niveau de la taille des échantillons, des méthodes de prélèvements et de détection de ces agents pathogènes. La standardisation de la méthode de détection des *Escherichia coli* O157

(norme ISO16654) ainsi que l'application de la directive de la commission européenne (2001/471/CE) définissant les quatre sites d'écouvillonnage au niveau des carcasses de bœuf et d'ovins ont permis d'asseoir une méthodologie de recherche performante. La majorité des souches STEC O157 isolées en Belgique et en Algérie présentent le pathotype *stx2 eae ehxA* considéré comme le plus dangereux pour la santé publique

Aucune association directe entre les taux élevés d'*E. coli* totaux et la présence de STEC O157 n'a pu être établie. *E. coli* ne semble pas être un indicateur pour la présence de cet agent pathogène mais, bien sûr, le niveau de contamination par les souches pathogènes doit diminuer en parallèle à la charge en *E. coli* totaux et que, donc, globalement le risque qu'elles présentent doit diminuer.

En ce qui concerne l'espèce ovine, Une prévalence égale à 0,7 % a été mise en évidence dans une autre étude en Grande-Bretagne (Chapman *et al.*, 2001). les résultats obtenus concernant le portage des STEC obtenus sont proches des résultats d'une étude

en Suisse qui a révélé la présence de STEC sans préciser le sérotype dans 29,9 % des matières fécales (Zweifel *et al.*, 2004). Les taux élevés de contamination fécale observés en Algérie laissent supposer que, si les animaux sont porteurs de STEC O157, le niveau de contamination des carcasses devrait être plus important qu'en Belgique.

En perspective, au niveau belge, les plans de surveillance doivent être maintenus surtout au niveau des matrices bovines : carcasses, viandes hachées, découpes afin d'évaluer les évolutions. 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. 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. Les critères microbiologiques européens du règlement (CE) n°2073/2005 vont encore accentuer les efforts des

industriels pour la maîtrise des agents pathogènes dans les filières à risque, même si les STEC O157 ne sont pas encore repris dans les critères de sécurité de ce règlement. Le développement de méthodes efficaces pour la recherche des autres sérotypes devrait permettre d'étendre la surveillance aux STEC non O157 les plus importants. Les données collectées au cours des plans de surveillance vont permettre de compléter les données disponibles pour une analyse du risque STEC O157 dans les filières à risque et particulièrement la filière bovine.

En Algérie, une application des plans HACCP au niveau des entreprises agroalimentaires et une surveillance des agents zoonotiques sont nécessaires. Des études complémentaires et approfondies grâce à la mise en place de moyens de diagnostic doivent être menées aussi bien au niveau humain qu'au niveau vétérinaire. Les résultats de ces études devront être considérés par la Direction des Services vétérinaires du Ministère de l'Agriculture en Algérie.

REFERENCES

- AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments : Maisons-Alfort, 2003, 220 p.
- BONARDI S., MAGGI E., PIZZIN G., MORABITO S., CAPRIOLI A. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **66**, 47-53.
- CHAPMAN P.A., CERDÁN MALO A.T., ELLIN M., ASHTON R., HARKIN M.A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **64**, 139-150.
- DÉCISION DE LA COMMISSION EUROPEENNE 2001/471/CE du 8 juin 2001 établissant les règles applicables au contrôle régulier de l'hygiène générale effectué par les exploitants dans les établissements conformément à la directive 64/433/CEE relative aux conditions de production et de mise sur le marché de viandes fraîches et à la directive 71/118/CEE relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges de viandes fraîches de volaille.
- DIRECTIVE 64/433/CEE du Conseil, du 26 juin 1964, relative à des

- problèmes sanitaires en matière d'échanges intracommunautaires de viandes fraîches Journal officiel n° 121 du 29/07/1964, 2012-2032.
- DIRECTIVE 2003/99/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC.
- DIRECTIVE 92/117/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 décembre 1992, concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certaines agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires, *Official Journal of the European Union*, 1993, LO 62, 38-48.
- ELDER R.O., KEEN J.E., SIRAGUSA G.R., BARKOCY-GALLAGHER G.A., KOOHMARAIE M., LAEGREID W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, **97**, 2999-3003.
- EUROPEAN COMMISSION, 2001, Verotoxigenic *Escherichia coli*, Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2001, P237-242.
- LUKÁSOVÁ J, ABRAHAM B, CUPÁKOVÁ S. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in raw material and food in Czech Republic. *J. Vet. Med. B.*, 2004, **51**, 77-81.
- McEVOY J.M., DOHERTY A.M., SHERIDAN J.J., THOMSON-CARTER F.M., GARVEY P., McGUIRE L., BLAIR I.S., McDOWELL D.A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157 :H7 at a commercial beef abattoir. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **95**, 256-266.
- MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT Arrêté royal du 28 août 2002 modifiant l'arrêté royal du 4 juillet 1996 relatif aux conditions générales et spéciales d'exploitation des abattoirs et d'autres établissements. *Moniteur Belge*, 2002.
- ZWEIFEL C., ZYCHOWSKA M.A., STEPHAN R. Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **92**, 45-53.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- KORSAK N., DAUBE G., CHAFIR Y., CHAHED A., JOLLY S., VINDEVOGEL H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 535-541.
- CHAHED A., DE ZUTTER, CHINA B., PIERARD D., GHAFIR Y., DAUBE G. Assessment of enterohemorrhagic *E. coli* contamination in Belgian beef minced meat. In : Proceedings of the third conference in Food Microbiology, 1998, Liège.
- CHAHED A., GHAFIR Y., CHINA B., DIERICK K., DE ZUTTER L., PIERARD D., DAUBE G. Survey of the contamination of food stuffs of animal origin by shiga toxin producing *E. coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003. *Eurosurveillance*, 2005, **10**, 9-10.
- CHAHED A., CHINA B., MAINIL J., DAUBE G. Prevalence of enterohemorrhagic *E. coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *E. coli* on bovine carcasses in Algeria. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, **101**, 361-368.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été menée grâce au soutien financier de l'Institut d'Expertise vétérinaire (IEV) puis de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) par le Laboratoire de Microbiologie des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège (ULg) et la collaboration du laboratoire 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) et deux laboratoires de l'AFSCA qui ont participé aux analyses à partir de 2003 et le laboratoire de référence des *E. coli* pathogènes de l'UZ-Brussel qui a typé les souches (UZ-Brussel).

Les études en Algérie ont été réalisées grâce au soutien du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique et de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alger avec la collaboration du laboratoire national de référence de microbiologie alimentaire de la faculté de médecine vétérinaire de l'ULg.