

***E. coli* verotoxiques :
E. coli O157:H7 et autres**

Pas de risque majeur en abattage - découpe de porc

Les *E. coli* verotoxiques (VTEC) ne semblent pas représenter actuellement un danger majeur en abattage-découpe de porc. En effet, notre étude, sur 4469 prélèvements (carcasses et pièces de découpe, fèces, environnement) analysés par PCR, le sérotype *E. coli* O157:H7 verotoxique, le plus impliqué dans les pathologies humaines graves telles que le Syndrome Hémolytique et Urémique, n'a jamais été détecté. 12 % des échantillons sur carcasses et pièces de découpe sont positifs en VTEC mais aucun des isolats ne semble potentiellement pathogène pour l'homme.

La majorité des souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Certaines souches peuvent cependant être pathogènes pour l'homme parmi elles se trouvent les *E. coli* verotoxiques (VTEC). Ces *E. coli* verotoxiques sont capables de produire des toxines appelées verotoxines et peuvent provoquer chez l'homme des diarrhées hémorragiques évoluant dans certains cas en des pathologies plus graves telles que le Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) parfois mortel, surtout chez l'enfant. *E. coli* O157:H7 est le sérotype de *E. coli* verotoxiques le plus impliqué dans de tels troubles, mais d'autres sérotypes O103, O26, O111 sont également incriminés, notamment en France.

Aujourd'hui, les *E. coli* verotoxiques sont considérés comme des agents pathogènes graves en santé humaine. Les contaminations sont essentiellement d'origine alimentaire et la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite en est la principale cause. Les accidents alimentaires liés aux VTEC mettant en cause la viande de porc sont exceptionnels. Cependant, la prévalence de *E. coli* O157:H7 et des autres *E. coli* verotoxiques dans la viande de porc n'était pas connue en France.

Dans le contexte actuel où les exigences en terme de sécurité sanitaire des aliments sont croissantes, il devenait urgent d'acquiescer des données épidémiologiques fiables sur ces germes dans la filière porcine française afin d'estimer le risque réel qu'ils représentent et proposer si nécessaire des moyens de maîtrise adaptés.

ROSSEL R. ⁽¹⁾, LE ROUX A. ⁽¹⁾, DE MONTZEY S. ⁽¹⁾, BOUVET J. ⁽²⁾,
MONTET M.-P. ⁽²⁾, BAVAI C. ⁽²⁾, VERNZOZY-ROZAND C. ⁽²⁾

⁽¹⁾ Institut Technique du Porc, Pôle Qualité du Produit,
BP 35104, 35651 LE RHEU Cedex

⁽²⁾ École Nationale Vétérinaire de Lyon, Unité de Microbiologie
Alimentaire et Prévisionnelle, BP 83, 69280 MARCY L'ÉTOILE

Étude réalisée avec la participation financière de la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche dans le cadre d'un programme AQS, de l'Ofival et de l'ANDA.

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE

La première étape de cette étude a été la mise au point d'une technique rapide, sensible et spécifique de détection

et d'isolement de *E. coli* O157:H7 et des autres VTEC dans différentes matrices issues de la filière porcine (viande, couenne, chiffonnettes, fèces) (schéma 1).

La détection par PCR

Les VTEC ont comme seule caractéristique commune la capacité de produire des verotoxines codées par les gènes *stx*. Par conséquent la technique d'analyse mise au point consiste, dans un premier temps, en une détection par PCR¹ de ces gènes.

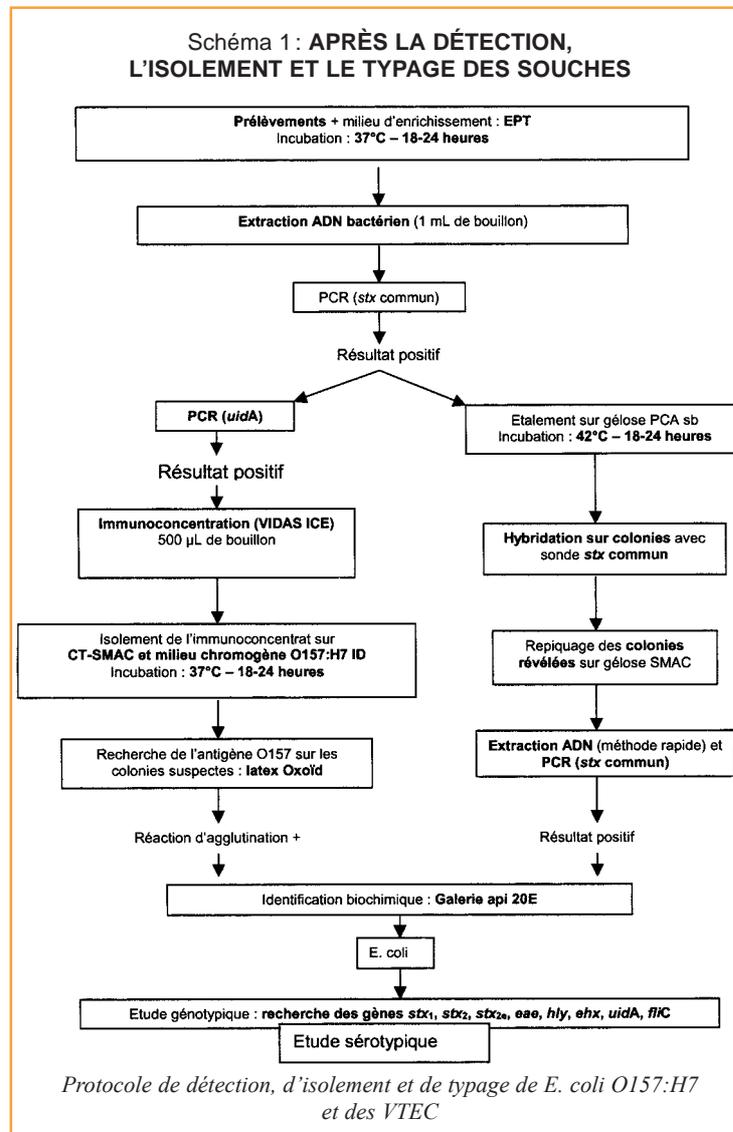
Ensuite, sur tout échantillon positif en PCR *stx*, donc positif en VTEC, une deuxième PCR est réalisée, détectant un gène spécifique du sérotype O157:H7, le gène *uidA*. Un résultat positif pour les deux PCR signe donc la détection d'un *E. coli* O157:H7 verotoxique.

Isoler et typer les souches pour identifier les pathogènes

L'isolement des souches a été effectué sur tous les échantillons positifs en PCR, soit après immuno-concentration (recherche du sérotype O157:H7) soit par hybridation sur boîte (recherche des autres VTEC). Sur les souches isolées, une confirmation biochimique de l'espèce *E. coli* a été réalisée car :

- l'Antigène de surface O157 est aussi présent chez des bactéries non *E. coli* telles que les *Brucella*, certaines *Salmonelles*...
- la PCR *stx* peut donner de faux positifs avec *Shigella dysenteriae*.

Toutes les souches isolées ont été sérotypées et caractérisées génétiquement afin de déterminer leur caractère pathogène.



¹ (Polymerase Chain Reaction = Amplification génique)

BŒUF ET PORC CRU : PLUS DE VTEC QUE DU SEUL SÉROTYPE O157:H7

	Pays	Aliment	Prévalence	Référence
<i>E. coli</i> O157:H7	USA	Bœuf cru	3,7 % (6/164)	Doyle et Schoeni, 1987
		Porc cru	1,5 % (3/264)	
	Canada	Bœuf cru	2,4 % (4/165)	Sekla et al., 1990
	France	Bœuf haché cru	0,1 % (4/3500)	Vernozy-Rozand et al., 2000
<i>E. coli</i> O157:H7 verotoxique	France	Porc cru (carcasse et pièces sur 25 cm ²)	0 % (0/2800)	Présente étude
VTEC	USA	Boeuf cru	23 % (14/60)	Samadpour et al., 1994
		Porc cru	18 % (9/51)	
	Canada	Bœuf cru	36 % (82/255)	Read et al., 1990
		Porc cru (25 g)	11 % (25/235)	
	UK	Bœuf haché cru	13 % (17/134)	Willshaw et al., 1993
		Saucisse de porc crue (25 g)	25 % (46/184)	
France	Porc cru (carcasses et pièces sur 25 cm ²)	12 % (340/2800)	Présente étude	

Prévalences dans quelques denrées alimentaires [6, 7]

Remarque : ces prévalences sont données à titre indicatif. Leur comparaison reste délicate car les méthodes d'analyses, les types de prélèvements, et les produits analysés ne sont pas toujours identiques.

MISE AU POINT SUR LA PATHOGÉNICITÉ DES *E. coli* VEROTOXIQUES (VTEC) [1, 2, 4, 6, 8]

Les *E. coli* verotoxiques en général

Le terme *E. coli* verotoxiques qualifie les souches d'*E. coli* porteuses d'au moins un gène codant une toxine appelée verotoxine. Il existe plusieurs types de verotoxines notés STX : STX1, STX2 et des variants de STX2 dont STX2e toxine surtout retrouvée dans les souches impliquées dans la maladie de l'œdème du porc. Les gènes correspondants sont notés *stx* (*stx*₁, *stx*₂ et variants de *stx*₂ dont *stx*_{2e}). Ces toxines peuvent provoquer des lésions au niveau du colon, du rein, et du cerveau.

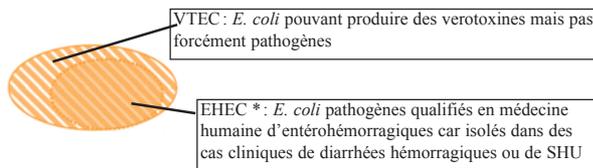
Posséder un des ces gènes *stx* est suffisant pour qualifier la souche de verotoxique mais n'est pas suffisant pour qu'elle soit potentiellement pathogène chez l'homme et donc à l'origine de diarrhées hémorragiques ou de SHU. En effet la majorité des experts s'accorde à dire que, pour qu'une souche de VTEC soit potentiellement pathogène, elle doit posséder au moins deux facteurs de virulence autres que ceux codant les verotoxines en l'occurrence :

- Elle doit pouvoir s'attacher aux cellules de la muqueuse intestinale et les détruire, et pour cela synthétiser une protéine, l'intimine, qui est codée par le gène *eae* (gène de l'attachement-effacement).
- Elle doit également pouvoir produire une entérohémolysine, codée par le gène *ehx*.

Tous les *E. coli* pathogènes à l'origine de diarrhées hémorragiques et de SHU, qualifiés d'entérohémorragiques en médecine humaine, sont des VTEC, donc possédant un gène *stx*, **à contrario** tous les VTEC ne sont pas pathogènes (cf. schéma 2)

Les VTEC potentiellement pathogènes doivent, en plus de produire des verotoxines (gène *stx*), pouvoir s'attacher aux entérocytes et les altérer (gène *eae*) et pouvoir produire une entérohémolysine (gène *ehx*).

Schéma 2



Le chef de file des VTEC : le sérotype *E. coli* O157:H7

Il existe au sein des VTEC plusieurs centaines de sérotypes. *E. coli* O157:H7 est le sérotype de VTEC le plus incriminé dans les cas cliniques de diarrhées hémorragiques et de SHU chez l'homme. La prépondérance clinique de ce sérotype est surtout vraie aux États-Unis où il est considéré comme un pathogène alimentaire majeur, mais aussi au Royaume-Uni, au Japon. En Europe continentale aussi, il est majoritairement impliqué dans les intoxications humaines mais, une des caractéristiques de cette zone géographique, est l'importance clinique de plusieurs autres sérotypes de VTEC notamment O103, O26, et O111.

*EHEC : *E. coli* Entérohémorragiques

CARTOGRAPHIE DE LA CONTAMINATION DES CARCASSES

Une cartographie de la contamination des carcasses permet d'identifier les sites les plus contaminés en VTEC. Si certains sites s'avèrent fortement contaminés, des précautions pourront être prises pour limiter cette contamination et pour éviter son amplification lors des transformations ultérieures. De plus, cette cartographie permettra de déterminer le ou les sites de prélèvement reflétant le mieux la contamination des carcasses, sites qui seront analysés préférentiellement dans le cadre d'un éventuel plan de contrôle mais aussi dans la suite de l'étude.

Cette phase doit également permettre d'estimer la prévalence de *E. coli* O157:H7 et autres VTEC sur les carcasses de porc.

Protocole

Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés dans 3 abattoirs à raison de 3 jours de prélèvements chacun.

Au total 50 carcasses par abattoir ont été prélevées après 18-24 heures de réfrigération.

Chaque carcasse a été prélevée sur huit sites (figure 1) :

- sites externes (sur couenne) : gorge, longe, poitrine, épaule, jambon (face interne),
- sites internes (sur viande) : poitrine, jambon, bavette

Sur chacun des sites, des prélèvements de 25 cm² de surface ont été réalisés par excision selon la norme AFNOR V04-501.

Analyses

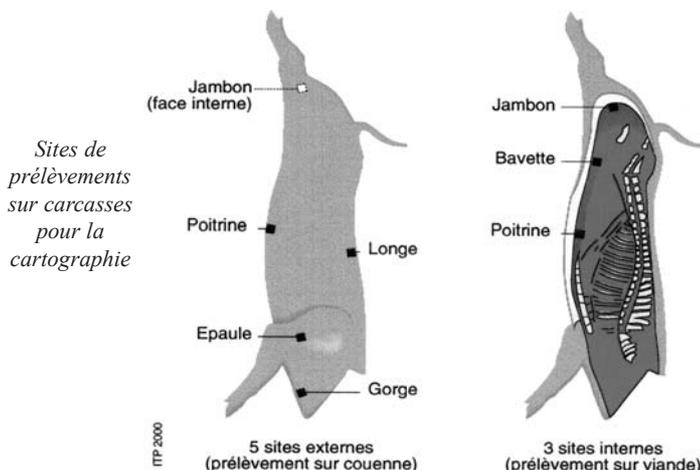
Chaque prélèvement a fait l'objet d'une recherche des VTEC par PCR *stx*, puis pour les positifs, de *E. coli* O157:H7, par PCR *uidA*, selon le protocole décrit ci-dessus.

13 % des échantillons sur carcasse sont positifs en VTEC

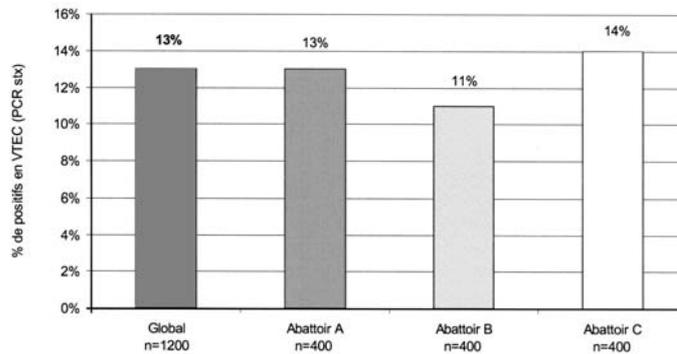
13 % (152/1200) des échantillons sont positifs en VTEC par PCR *stx*, sans différence significative entre les trois abattoirs (test du χ^2 ; p = 0,351) et ce malgré leur différence de process (graphique 1).

Figure 1 – 8 SITES DE PRÉLÈVEMENT PAR CARCASSE

- ▼ Prélèvement par excision de 25 cm² de surface sans cautérisation (NF V04-501).
- ▼ 8 sites de prélèvement par carcasse



Graphique 1 – UNE PRÉVALENCE ÉQUIVALENTE QUEL QUE SOIT L'ABATTOIR



Pourcentages de prélèvements sur carcasses positifs en VTEC (excision de 25 cm²)

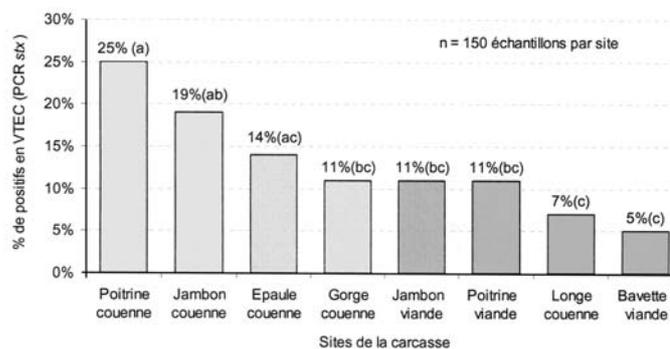
Aucun des 1200 échantillons prélevés par excision de 25 cm² sur carcasses de porc réfrigérées et, par conséquent, aucune des 150 carcasses correspondantes, n'a été détecté positif en *E. coli* O157:H7 verotoxique par PCR. Par contre, 13 % des échantillons donnent un signal PCR positif vis-à-vis des autres VTEC. La moitié des carcasses, après réfrigération, est positive en VTEC par PCR. La poitrine et le jambon sur couenne sont les sites de la carcasse les plus contaminés en VTEC.

La poitrine sur couenne: la plus contaminée en VTEC

Tous abattoirs confondus une différence de contamination significative existe entre les sites (test du χ^2 ; $p = 0,001$) (graphique 2). La poitrine sur couenne est le site le plus contaminé en VTEC avec 25 % (37/150) des échantillons positifs en PCR *stx*. Elle a un niveau de contamination non différent du jambon et de l'épaule sur couenne mais est significativement plus contaminée que les cinq autres sites. Le jambon sur couenne est, au global, le deuxième site le plus contaminé en VTEC, 19 % (28/150) des échantillons positifs en PCR *stx*, et ce de façon significative par rapport à la longe sur couenne et bavette sur viande (test du χ^2 en comparaisons multiples)².

Cette classification ne se retrouve pas à l'identique dans les trois abattoirs toutefois les sites poitrine et jambon sur la couenne sont toujours parmi les 3 sites les plus contaminés.

Graphique 2 – POITRINE, JAMBON ET ÉPAULE SUR COUENNE À SURVEILLER EN PRIORITÉ



Pourcentages de présence de VTEC selon les sites de la carcasse (excision de 25 cm²)

Des lettres différentes (a, b, c) correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 %.

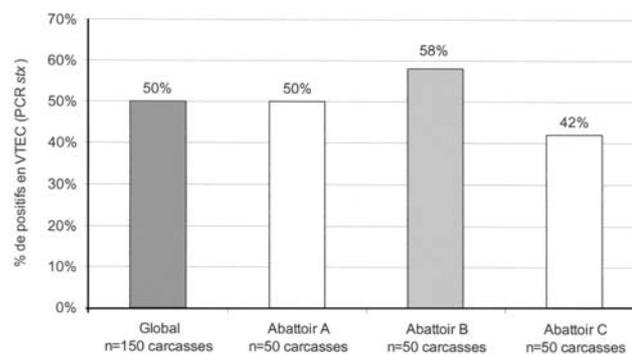
Après réfrigération, la moitié des carcasses est contaminée en VTEC

Lorsque huit sites sont prélevés par carcasses, des VTEC sont mis en évidence par PCR *stx* sur 50 % (75/150) d'entre elles en moyenne, sans effet abattoir (test du χ^2 ; $p = 0,278$) (graphique 3). Un effet jour n'existe que dans l'abattoir A. Ce pourcentage peut paraître élevé mais la moitié (39/75) des carcasses contaminées en VTEC ne l'est que sur un seul site et seulement un quart (20/75) l'est sur plus de deux sites. Les VTEC sont donc souvent présents mais de façon ponctuelle sur les carcasses.

Pas de *E. coli* O157:H7 verotoxique

Aucun des 152 prélèvements positifs en VTEC par PCR *stx* s'est avéré positif pour la recherche de *E. coli* O157:H7 par PCR *uidA*.

Graphique 3 – 50 % DES CARCASSES RÉFRIGÉRÉES CONTAMINÉES



Pourcentages de carcasses contaminées en VTEC (excision de 25 cm² sur 8 sites)

²Dans les comparaisons multiples le risque global est de 5 % et pour chaque comparaison le risque est corrigé selon la formule de Dunnsidak.

ÉVOLUTION DE LA CONTAMINATION AU COURS DE L'ABATTAGE

Ce volet a comme objectif d'estimer l'évolution de la contamination des carcasses de porc en *E. coli* O157:H7 et autres VTEC au cours des opérations d'abattage, de la saignée jusqu'à la sortie du ressuage. Afin d'estimer le portage intestinal et son rôle éventuel dans la contamination des carcasses, des prélèvements de fèces ont été effectués sur les mêmes carcasses que celles prélevées en surface. En parallèle, la contamination des locaux après nettoyage-désinfection et son évolution en cours de tuerie ont été étudiées, ainsi que la contamination de l'eau d'échaudage et de l'eau du réseau.

Protocole : Suivre les carcasses, les fèces et les locaux

Les prélèvements ont été réalisés dans trois abattoirs à raison de 2 journées chacun.

Prélèvements de surface sur carcasses

Pour chaque journée, 30 carcasses ont été prélevées à trois stades :
- À la saignée
- En fin de chaîne au niveau de la pesée
- Après la première phase de ressuage

Pour chaque carcasse, les prélèvements ont été réalisés par chiffonnage de la couenne sur 100 cm² sur le jambon, l'épaule et la poitrine soit 300 cm² au total par carcasse. Les mêmes carcasses ont été prélevées aux 3 stades sur des zones juxtaposées.

Ces trois sites, poitrine, jambon et épaule sur couenne, ont été choisis car ce sont en moyenne les plus contaminés au vu de la cartographie de la contamination des carcasses en VTEC.

Prélèvements de fèces sur les mêmes carcasses

25 g de fèces ont été prélevés, sur les carcasses décrites ci-dessus, lors de l'éviscération. Les prélèvements ont été réalisés au niveau du caecum, avec du matériel stérile, après flambage de la paroi externe de l'intestin.

Les analyses ont été effectuées sur 1 g de matières fécales.

Prélèvement dans les locaux

Des prélèvements ont été réalisés sur les locaux et les matériels par chiffonnage d'une surface d'environ 1 m² (pour le petit matériel tout l'outil est chiffonné) à trois instants :
- après nettoyage-désinfection,
- après deux heures de tuerie,
- après six heures de tuerie.

À chaque journée de prélèvement, 25 sites ont été prélevés, répartis dans les trois zones de la chaîne d'abattage :
- la préparation externe (de l'anesthésie à la sortie du four),
- le hall d'habillage (de la sortie du four à l'entrée en frigo de ressuage),
- le ressuage (1er frigo de ressuage rapide).

Prélèvement d'eau d'échaudage

L'eau du bac d'échaudage a été prélevée avant le début de tuerie et après quatre heures de tuerie. À chaque instant, deux prélèvements, ont été réalisés à l'entrée du bac et deux à la sortie, soit huit échantillons, de 250 ml chacun, par journée de prélèvement.

Ces prélèvements n'ont pas été réalisés dans l'abattoir C car il n'y a pas d'échaudage, l'épilation se faisant par flambage-grattage.

Prélèvement d'eau du réseau

À chaque journée, deux prélèvements, de 500 ml chacun, ont été prélevés à deux sources puis analysés après filtration.

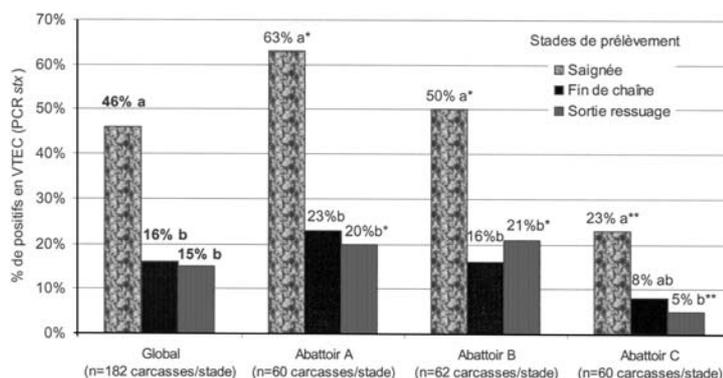
Analyses

Chaque prélèvement a fait l'objet d'une recherche des VTEC par PCR *stx*, puis pour les positifs, de *E. coli* O157:H7, par PCR *uidA*, selon le protocole décrit ci-dessus.

La contamination des carcasses diminue au cours du process

Au cours du process d'abattage, le pourcentage moyen de carcasses positives en VTEC, par PCR *stx*, diminue significativement entre le début et la fin de la chaîne. La phase de premier ressuage, elle, ne modifie pas significativement le pourcentage de carcasses positives (comparaisons multiples en séries appariées avec des tests de Mc Nemar). Cette tendance se constate dans chaque abattoir (graphique 4)

Graphique 4 – MOINS DE CARCASSES CONTAMINÉES EN FIN DE CHAÎNE



Évolution de la contamination des carcasses en VTEC au cours du process d'abattage (chiffonnage de 300 cm²)

Dans un même abattoir, des lettres différentes (a, b, c) correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples).
Pour un même stade, un nombre de * différent correspond à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2 en comparaisons multiples).

46 % des porcs positifs à la saignée...

A la saignée 46 % (83/182) des porcs, en moyenne, sont positifs en VTEC par PCR *stx* sur la couenne, avec des différences significatives entre abattoirs (test du χ^2 , $p = 0,001$) (graphique 4). Un effet jour existe dans l'abattoir A (graphique 6).

Ces différences peuvent être dues :

- à des statuts sanitaires différents des animaux entre abattoirs, cependant, les résultats sur fèces ne vont pas dans ce sens,
- à des variations journalières de contaminations croisées liées aux stress et manipulations lors du transport et du stockage des animaux ;
- à des volumes d'abattage différents. En effet, l'abattoir C a un volume d'abattage nettement inférieur aux deux autres et donc le volume d'animaux abattus étant moindre, la charge bactérienne dans l'abattoir serait également moindre.

...contre 16 % des carcasses contaminées en fin de chaîne...

En fin de chaîne 16 % (29/182) des carcasses sont détectées positives en VTEC par PCR *stx*, sans différence significative entre les abattoirs (test du χ^2 , $p = 0,08$) et sans effet jour mis en évidence intra-abattoir (test du χ^2 , ou exact de Fisher, $p > 0,05$) (graphique 4).

Tous abattoirs confondus, près des deux tiers (18/29) des carcasses détectées contaminées en fin de chaîne l'étaient déjà à la saignée avec cependant des différences entre abattoir. En effet, ce lien de contamination entre saignée et fin de chaîne est plus ou moins marqué. Respectivement dans les abattoirs A, B et C, 79 %, 60 % et seulement 20 % des carcasses trouvées positives en fin de chaîne l'étaient déjà à la saignée. La contamination en fin de chaîne semble donc particulièrement liée à la contamination initiale des animaux surtout lorsque celle-ci est élevée.

... et 15 % en sortie de ressuage

À la sortie du ressuage, 15 % (28/182) des carcasses sont contaminées en VTEC avec des différences significatives entre les abattoirs (test du χ^2 , $p = 0,024$) mais sans effet jour intra-abattoir (graphique 4).

Globalement, 57 % des carcasses positives en sortie ressuage étaient positives à la saignée. Comme précédemment, ce lien est plus ou moins marqué selon les abattoirs.

Le portage intestinal est important...

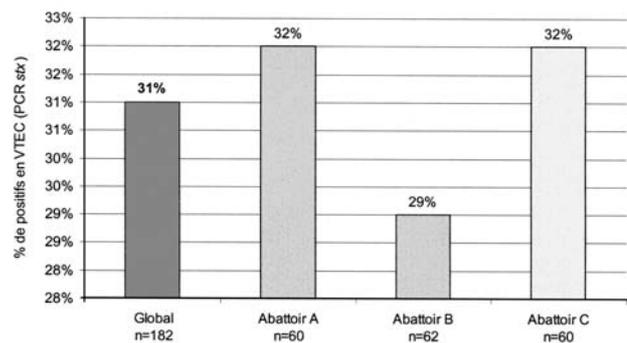
Environ un tiers (56/182) des prélèvements de fèces sont positifs en VTEC par PCR *stx* sans différence de pourcentage moyen par abattoir (test du χ^2 ; $p = 0,936$) (graphique 5). Toutefois il existe des variations journalières tous abattoirs confondus (test du χ^2 ; $p = 0,011$) et aussi intra-abattoir (tests du χ^2 , $p < 0,05$). Il est intéressant de noter que pour un abattoir donné, les éventuelles différences de contamination au niveau fécal entre deux répétitions ne se retrouvent jamais au niveau de la contamination de surface des animaux à la saignée (graphique 6).

... mais la contamination de surface est surtout due aux contaminations croisées

Près de la moitié (46 %) des porcs porteurs de VTEC au niveau digestif sont contaminés en surface au stade saignée. Il existe des variations entre abattoirs (A : 74 % ; B : 50 % ; C : 16 %). D'autre part, environ deux tiers (69 %) des porcs contaminés en surface à la saignée ne sont pas porteurs au niveau digestif. Cette tendance se confirme dans les trois abattoirs A, B et C où respectivement 63 %, 71 %, 79 % des carcasses positives à la saignée sont issues d'animaux non porteurs.

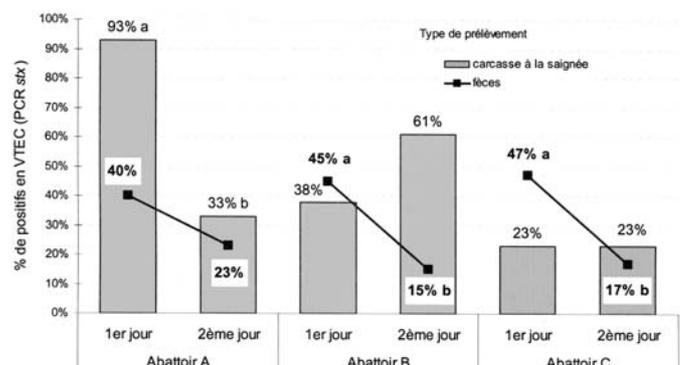
La contamination des carcasses à la saignée semble due, en majeure partie, à des contaminations croisées avant abattage plus qu'au statut sanitaire individuel de l'animal.

Graphique 5 — UN TIERS DES FÈCES CONTAMINÉS



Pourcentages moyens de fèces positifs en VTEC sur 1 g (excision de 25 cm²)

Graphique 6 – CONTAMINATION DES CARCASSES ET DES FÈCES ÉVOLUENT DIFFÉREMMENT



Pourcentages de carcasses positives en VTEC en surface et sur fèces

Dans un même abattoir et pour un même type de prélèvement, des lettres différentes (a, b) correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2).



Environ 20 % des animaux porteurs de VTEC au niveau digestif sont retrouvés positifs en surface en fin de chaîne. D'autre part, deux tiers (66 %) des porcs contaminés en surface en fin de chaîne ne sont pas porteurs au niveau digestif (respectivement pour les abattoirs A, B et C : 57 %, 80 %, et 60 %).

Ces résultats soulignent à nouveau l'importance des contaminations croisées dans la contamination des carcasses en fin de ligne d'abattage plus que le statut individuel de l'animal.

En sortie de ressuage, la même tendance se constate.

Seulement 23 % des porteurs digestifs sont positifs en surface à la sortie de ressuage et la moitié (54 %) des carcasses contaminées en sortie de ressuage sont issues de porcs non porteurs.

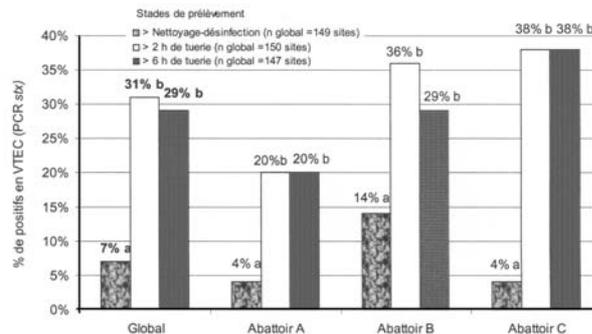
La contamination des locaux augmente au fur et à mesure de l'abattage

Après nettoyage-désinfection certains sites restent positifs en VTEC par PCR *stx* (graphique 7). Il convient toutefois de rester prudent dans l'interprétation de ces résultats du fait qu'il s'agit de résultats de PCR. Soit effectivement les opérations de nettoyage-désinfection réalisées ne permettent, dans aucun abattoir, d'éliminer systématiquement tous les VTEC présents sur les locaux de la chaîne d'abattage et du premier ressuage, soit les signaux positifs en PCR correspondent en fait à de l'ADN de VTEC morts à la suite du nettoyage-désinfection.

En moyenne, les pourcentages de sites contaminés en VTEC augmentent de manière significative durant les premières heures de tuerie passant de 7 % (11/149) à 31 % (47/150) puis se stabilisent à 29 % (43/147) par la suite. La même tendance se constate dans les trois abattoirs (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples) (graphique 7). Cette augmentation s'explique par le passage sur la chaîne d'abattage de carcasses contaminées et par contamination croisée de l'environnement via les carcasses, les opérateurs, le matériel.

Les taux de contamination obtenus pour tous les abattoirs après 6 heures montrent la nécessité de réaliser un nettoyage-désinfection rigoureux en fin d'activité pour limiter les risques de contamination des carcasses en VTEC.

Graphique 7 – FORTE AUGMENTATION DE LA CONTAMINATION DURANT L'ABATTAGE



Évolution de la contamination en VTEC des locaux d'abattage

Dans un même abattoir, des lettres différentes (a, b, c) correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples).

Pour un même stade, un nombre de * différent correspond à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2 ou exact de Fisher)

A aucun des trois stades, il n'y a de différence significative de contamination moyenne entre les abattoirs (tests du χ^2 ou exact de Fisher; $p = 0,113$; $p = 0,104$; $p = 0,157$) par contre des différences journalières significatives existent intra-abattoir (tests du χ^2 ou exact de Fisher, $p < 0,05$).

Une Contamination comparable dans toutes les zones de l'abattoir

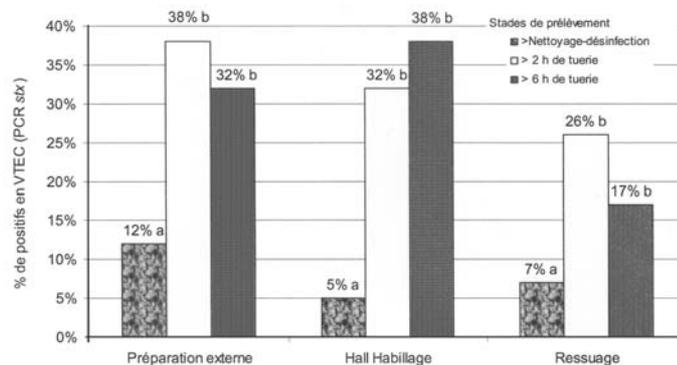
Il est par ailleurs intéressant d'étudier si la contamination des locaux est uniforme ou si elle varie selon les zones de la chaîne :

- préparation externe;
- hall d'habillage;
- ressuage.

Par zone, on constate la même évolution dans le temps à savoir une augmentation significative de la contamination dans les premières heures de tuerie puis une stabilisation (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples) (graphique 8).

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, les trois zones sont contaminées de façon similaire après nettoyage-désinfection et après deux heures d'activité (tests du χ^2 ou exact de Fisher $p = 0,482$; $p = 0,470$). La seule différence significative apparaît après six heures de tuerie où le hall d'habillage est en moyenne plus contaminé que le ressuage (test du χ^2 , $p = 0,041$ et tests du χ^2 en comparaisons multiples).

Graphique 8 – EXPLOSION DES CONTAMINATIONS LES DEUX PREMIÈRES HEURES D'ABATTAGE



Évolution de la contamination en VTEC des différentes zones de l'abattoir

Pour une même zone, des lettres différentes (a, b, c) correspond à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples)

En effet, on aurait pu supposer que la zone de préparation externe des carcasses, difficilement nettoyable et plus exposée aux contaminations de surface des carcasses, soit plus contaminée que les deux autres zones. Ceci d'autant plus que le taux de contamination des carcasses en début de chaîne est plus élevé qu'aux autres stades.

L'eau d'échaudage : une source potentielle de contaminations

Sur 31 prélèvements d'eau d'échaudage, trois sont positifs en VTEC par PCR *stx* dont un avant même le début de la tuerie.

L'eau d'échaudage semble être une source potentielle de contamination en VTEC. Toutefois, notons que ces résultats positifs de PCR peuvent ne signer que la présence d'ADN de bactéries mortes ou non cultivables. En effet les températures d'échaudage, aux alentours de 60 °C ne dénaturent pas l'ADN.

Sur 22 prélèvements réalisés sur l'eau de réseau, deux sont VTEC positif en PCR. Ils proviennent tous les deux de l'abattoir C pour un même jour de prélèvement.

Pas de *E. coli* O157:H7 vérotoxiques

Sur les 302 échantillons positifs en PCR *stx*, 3 ont donné un signal positif pour le gène *uidA*, spécifique du sérotype O157:H7.

Toutefois après immuno-concentration aucune souche n'a été isolée. Après différents screenings par PCR il semblerait que les souches à

l'origine du signal *uidA* soient des souches *E. coli* O157:H7 non vérotoxiques.

ÉVOLUTION DE LA CONTAMINATION AU COURS DE LA DÉCOUPE

Cette partie a pour objectif d'évaluer l'évolution de la contamination en VTEC des pièces au cours de la découpe. En parallèle, la contamination des locaux de découpe après nettoyage-désinfection et son évolution en cours d'activité ont été étudiées. Des prélèvements ont également été réalisés sur l'eau du réseau.

Des prélèvements dans trois ateliers de découpe

Les prélèvements ont été réalisés dans trois ateliers de découpe avec deux jours de prélèvement par atelier.

Prélèvements sur carcasses et pièces

Les prélèvements ont été réalisés sur des carcasses avant découpe puis sur les pièces qui en sont issues en découpe primaire (pièces brutes) et découpe secondaire (pièces découennées-désossées). Les prélèvements ont été réalisés par excision de 25 cm² de surface selon la norme Afnor V04-501, sur couenne pour les carcasses et pièces brutes, sur viande à la place de l'os pour les pièces découennées-désossées (selon les sites du guide « Définition des critères microbiologiques dans les cahiers des charges carcasses et pièces de découpe de porc »).

Dans les ateliers A et B, 50 carcasses ont été prélevées avant entrée en découpe, chacune au niveau du jambon, de l'épaule, de la poitrine et de la longe. Les quatre mêmes pièces ont ensuite été prélevées en découpe. Dans l'atelier C certaines pièces ne sont pas travaillées en découpe, de ce fait, le même schéma n'a pu être suivi. La poitrine, par exemple n'a jamais été prélevée

Prélèvement des locaux

À chaque journée de prélèvement, 25 sites ont été prélevés par chiffonnage sur environ 1 m² (pour le petit matériel tout l'outil est chiffonné) à trois instants :

- après nettoyage-désinfection,
- après deux heures d'activité,
- après six heures d'activité.

Prélèvement d'eau du réseau

À chaque journée, deux prélèvements d'eau du réseau, de cinq litres chacun, ont été effectués (selon les préconisations de la norme ISO 6340).

Analyses

Chaque prélèvement a fait l'objet d'une recherche des VTEC par PCR *stx*, puis pour les positifs, de *E. coli* O157:H7, par PCR *uidA*, selon le protocole décrit précédemment.

12 % des produits en découpe sont positifs en VTEC

Tous produits confondus (carcasses et pièces), 12 % (188/1600) des échantillons sont positifs en VTEC par PCR, avec des différences significatives entre ateliers (tests du χ^2 , $p = 0,001$) (graphique 9).

La découpe primaire est plus fortement contaminée

Globalement, la contamination augmente significativement entre le stade carcasse et le stade découpe primaire passant de 12 % (61/525) à 19 % (99/525) puis diminue significativement à 5 % (28/550) sur les pièces de découpe secondaire (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples). La même tendance se dégage dans les trois ateliers.

À chacun des trois stades, des différences significatives de contamination existent entre ateliers (tests du χ^2 ; $p < 0,05$ et tests du χ^2 en comparaisons multiples) (graphique 10).

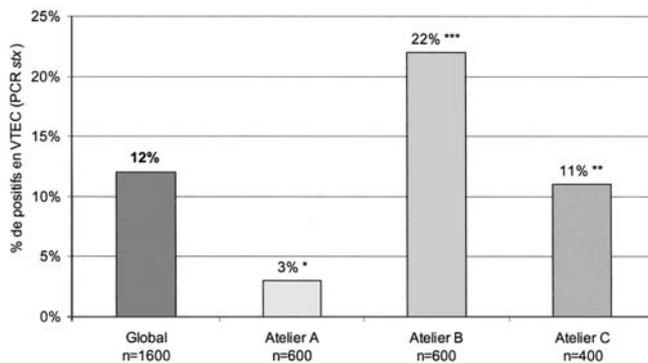
Sur 1 227 prélèvements réalisés en abattoir (chiffonnage carcasses, fèces, environnement), aucun n'a été détecté positif en *E. coli* O157:H7 vérotoxique par PCR.

Les animaux vivants sont une source importante d'introduction de VTEC dans les abattoirs, un tiers d'entre eux est détecté porteur au niveau digestif et près de la moitié est détectée contaminée en surface dès la saignée. Cette contamination de la couenne à la saignée semble due à des contaminations croisées avant abattage plutôt qu'au statut sanitaire individuel de l'animal.

Au cours du processus d'abattage, la contamination des carcasses en VTEC diminue entre la saignée et la fin de chaîne. Elle reste stable au cours du ressuage. La contamination des carcasses semble particulièrement liée à la contamination initiale des animaux.

La contamination en VTEC des locaux d'abattage et de réfrigération souligne leur rôle potentiel dans la contamination croisée des carcasses ainsi que la nécessité de réaliser un nettoyage-désinfection efficace de ces zones après toute journée d'activité.

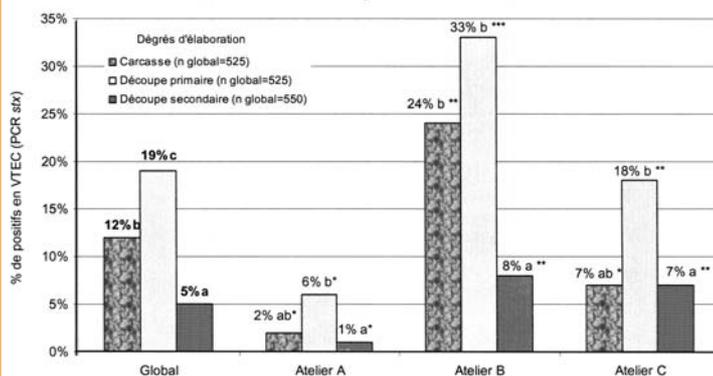
Graphique 9 – DES DIFFÉRENCES SIGNIFICATIVES ENTRE ATELIERS DE DÉCOUPE



Pourcentages d'échantillons positifs en VTEC, carcasses et pièces confondues (excision de 25 cm²)

Un nombre de * différent correspond à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2 en comparaisons multiples)

Graphique 10 – LES OPÉRATIONS DE DÉCOUPE PRIMAIRE SONT CONTAMINANTES



Évolution du pourcentage de positifs en VTEC selon le degré d'élaboration des produits (excision de 25 cm²)

Pour un même degré d'élaboration, un nombre de * différent correspond à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2 en comparaisons multiples)

Pour un même atelier, des lettres différentes correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples).

Les opérations de découpe primaire se révèlent donc être particulièrement contaminantes. Les manipulations que subissent les pièces expliquent aisément cette évolution sachant que les prélèvements sont réalisés sur la couenne.

Les voies de contamination possibles pour expliquer ces augmentations sont :

- contacts entre carcasses avant affilage et sur les tapis ;
- contacts avec les tapis, les tables, les couteaux ;

- contact des pièces entre elles sur les tapis, sur les systèmes d'accrochage ;
- projection lors de l'utilisation de la scie ;
- manipulations par les opérateurs.

Les pièces découennées-désossées, bien que plus manipulées, ont un niveau de contamination moindre. Ceci s'explique par le fait que, dans notre étude, les prélèvements sont réalisés sur viande et pour certains sur des muscles découverts juste au moment du désossage. Ainsi, ces

surfaces sont initialement stériles et beaucoup moins sujettes aux contaminations croisées en salle de découpe.

La contamination des pièces dépend donc pour partie du niveau de contamination de la matière première, mais, également et surtout, des contaminations croisées liées au processus de découpe et au respect des règles d'hygiène. En effet, pour un niveau de contamination des carcasses non significativement différent (cas des ateliers A et C), les pièces brutes peuvent être plus ou moins contaminées. À l'inverse, les pièces découennées-désossées peuvent être peu contaminées même si la contamination des carcasses et des pièces brutes est élevée (atelier B).

Pour limiter cette contamination en cours de découpe, il est nécessaire de respecter les bonnes pratiques hygiéniques à savoir, mettre les pièces côté couenne et non côté viande sur les supports (tables, tapis), éviter les accumulations de pièces, positionner les produits couenne contre couenne, viande contre viande sur les systèmes d'accrochage, etc.

La contamination en VTEC des locaux de découpe augmente avec l'activité

Après nettoyage-désinfection certains sites des locaux de découpe restent contaminés en VTEC par PCR *stx* (graphique 11). Cependant d'une part le niveau de contamination reste très faible, 3 % (4/144) au global, sans différence de contamination moyenne entre les ateliers (test exact de Fisher, p = 0,121) et d'autre part, comme nous l'avons déjà vu, ces résultats PCR positifs correspondent peut-être seulement à l'ADN de VTEC morts après nettoyage-désinfection. Il convient donc de rester prudent quant à l'interprétation de la qualité du nettoyage-désinfection au vu seulement de ces résultats.

Les sites trouvés positifs en PCR *stx* après nettoyage-désinfection sont des sites structurels tels que les murs mais aussi des sites en contact direct avec les produits tels que des tables et des tapis de découpe.

Le pourcentage de sites contaminés augmente significativement durant les deux premières heures de découpe passant de 3 % à 25 % (36/144) puis se stabilise à 20 % (29/142) (graphique 11) (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples). Des différences significatives entre ateliers existent à chaque stade (tests du χ^2 , $p < 0,05$).

Cette augmentation s'explique par le passage en découpe de produits contaminés en VTEC et par des contaminations croisées via les opérateurs, le matériel... Il est intéressant de noter qu'entre le stade « 2 heures » et le stade « 6 heures », derrière une apparente stabilité de contamination se cachent en réalité de nouvelles contaminations. En effet, la moitié (46 %) des sites contaminés après 6 heures d'activité ne l'était pas à 2 heures. Par ailleurs, plus de la moitié (58 %) des sites contaminés à 2 heures est négative à 6 heures probablement parce que les germes ont été enlevés par le premier prélèvement. On peut supposer qu'une série de prélèvements unique après 6 heures d'activité aurait révélé un taux de contamination bien supérieur. Ces résultats confirment la nécessité de réaliser un nettoyage-désinfection rigoureux en fin d'activité et expliquent pour partie la proportion de pièces qui se contaminent par passage en découpe.

Contamination en VTEC de l'eau du réseau

Sur 12 prélèvements réalisés sur l'eau du réseau, aucun n'est positif en VTEC par PCR *stx*.

Sur 2042 prélèvements réalisés en découpe (carcasses et pièces sur 25 cm², environnement), aucun n'a été détecté positif en *E. coli* O157:H7 verotoxique par PCR. En moyenne, 12 % des pièces de découpe sont positives en VTEC par PCR *stx*, les pièces brutes étant significativement plus contaminées que les pièces découennées-déossées, 19 % contre 5 %. La contamination des pièces dépend particulièrement des contaminations croisées. En découpe, comme à l'abattoir, les locaux jouent certainement un rôle non négligeable dans les contaminations croisées des produits.

Pas de Contamination en *E. coli* O157:H7

Aucun des 257 échantillons positifs en VTEC par PCR *stx*, n'est positif en PCR *uidA*, spécifique du serotype O157:H7.

PAS DE PRÉSENCE D'*E. coli* VEROTOXIQUES PATHOGÈNES DANS CETTE ÉTUDE

Protocole: Isolement et typage

Les échantillons ayant donné un signal PCR positif ont subi immunoconcentration (pour les positifs en PCR *stx* et *uidA*) ou hybridation sur boîte (pour les positifs en PCR *stx* seulement) afin d'isoler les souches à l'origine de ces signaux PCR.

Les isolats ainsi obtenus ont été typés: sérotypage et génotypage afin de déterminer leur pathogénicité potentielle.

Les sérotypes testés sont les principaux EHEC retrouvés sur les malades en France: O103, O26, O111, O157 et O55.

Plusieurs gènes ont été recherchés mais nous ne nous intéresserons ici qu'aux trois gènes considérés comme indispensables à la pathogénicité d'une souche de VTEC à savoir les gènes *stx* codant les verotoxines (*stx*₁, *stx*₂ ou un de ses variants), *eae* codant le facteur d'attachement-effacement et *ehx* codant l'entérohémolysine (cf. encadré).

Des souches de *E. coli* O157:H7 non verotoxiques

Sur les 4469 échantillons analysés dans l'étude aucun *E. coli* O157:H7 n'a été isolé malgré 3 signaux PCR *uidA* positifs.

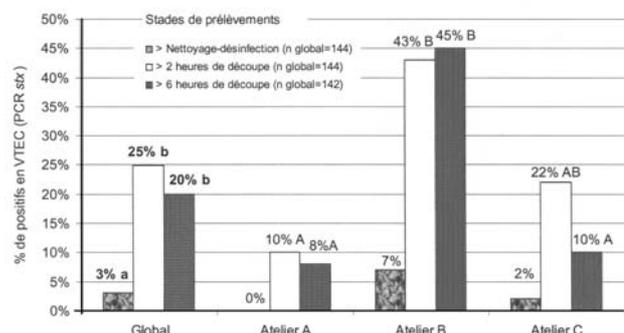
Après différents screenings, le signal *uidA* a pu être détecté sur des bouillons n'étant pas positifs avec la PCR *stx*. Il semblerait donc que les souches à l'origine du signal *uidA* soient des souches *E. coli* O157:H7 non verotoxiques.

Des souches verotoxiques non pathogènes pour l'homme

Sur les 711 échantillons (produits carnés, fèces et environnement) positifs en VTEC par PCR *stx*, 598 ont subi une hybridation sur boîte et 73 ont permis d'obtenir 116 isolats, soit un taux moyen de confirmation de 12 % (73 échantillons positifs en PCR *stx* ont permis l'isolement de souches/598 échantillons positifs en PCR *stx* passés en hybridation sur boîte). Ce taux de confirmation est relativement faible mais cohérent avec ceux trouvés par d'autres auteurs, 17,6 % pour Rogerie et al. (2001), 14,8 % pour Read et al. (1990).

L'explication en serait le faible niveau de contamination en VTEC des matrices étudiées. Lors de l'isolement sur boîtes, la croissance des VTEC serait inhibée par les autres flores, plus nombreuses.

Graphique 11 – DE FORTES DISPARITÉS DE CONTAMINATION ENTRE ATELIERS DE DÉCOUPE



Évolution de la contamination en VTEC des locaux de découpe

Pour un stade, des lettres majuscules (A, B) différentes correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests du χ^2 ou exact de Fisher en comparaisons multiples).

Au global, des lettres minuscules (a, b, c) différentes correspondent à une différence significative entre les % au risque global de 5 % (tests de Mc Nemar en comparaisons multiples).

Sur les 116 isolats obtenus, 112 n'appartiennent pas aux cinq sérogroupes testés, O26, O55, O103, O111 et O157, un isolat appartient au séro-groupe O55 et 3 au séro-groupe O103.

Sur les 116 isolats, un seul semble potentiellement pathogène au vu de son génotype : *stx*₁⁻, *stx*₂⁺, *stx*_{2c}⁻, *eae*⁺, *ehx*⁺, *uidA*⁻, mais il n'appartient à aucun des sérogroupes d'EHEC testés. Cet isolat sera testé sur culture cellulaire afin de voir si la production de verotoxine est effective.

86 % des isolats sont porteurs du gène *stx*_{2c} considéré le plus souvent comme codant une verotoxine non pathogène pour l'homme.

PAS DE RISQUE MAJEUR SUR LA VIANDE DE PORC AUJOURD'HUI

Cette étude a permis de connaître les niveaux de contamination des carcasses et pièces de découpe de porc en VTEC, dont *E. coli* O157:H7, et d'apprécier les principaux vecteurs de contamination au cours des opérations d'abattage et de découpe.

D'autre part, la caractérisation génotypique et sérotypique des souches isolées permet de dire que, à l'heure actuelle, en France, les VTEC ne semblent pas représenter un danger majeur en abattage-découpe de porc.

Remerciements

Nous remercions bioMérieux
et les trois industriels de
l'abattage-découpe de porc
pour avoir participé
à cette étude.



B I B L I O G R A P H I E

(1) MARIANI-KURKDJIAN, P., BINGEN, E. (1999). *Escherichia coli* O157:H7, un pathogène émergent. La presse Médicale, 28, 2067-2074.

(2) PATON, A.W. AND PATON, J.C. (1998). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. Journal of Clinical Microbiology, 36, 598-602.

(3) READ, S.C., GYLES, C.L., CLARKE, R.C., LIOR, H., MCEWEN, S. (1990). Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario. Epidemiol. Infect., 105, 11-20.

(4) REID, S.D., BETTING, D.J. AND WHITTAM, T.S. (1999). Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 37, 2719-2722.

(5) ROGERIE, F., MARECAT, A., GAMBADE, S., DUPOND, F., BEAUBOIS, P., LANGE, M. (2001). Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. Int. J. Food Microbiol., 63, 217-223.

(6) VERNZOY-ROZAND, C., RAY-GUENIOT, S. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 : Étude clinique, pathogénique, épidémiologique et prévention des accidents alimentaires. Rev. Méd. Vét., 148, 2, 89-98

(7) VERNZOY-ROZAND, C., RAY-GUENIOT, S., MAZUY, C., BAVAI, C., MONTET, M.P., MEYRAND, A., BOUVET, J. (2000). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in industrial minced beef in France. Poster présenté à Los Angeles du 21 au 25 mai 2000.

(8) VERNZOY-ROZAND, MONTET M. P. (2001). *Escherichia coli* O157:H7. Collection Monographies de microbiologie. Ed. Tec et Doc.