

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الجيلالي بونعاما خميس مليانة  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie



## *Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention de diplôme de **Master** en biotechnologies

**Domaine :** Science de la nature et de la vie  
**Filière :** Biotechnologies  
**Spécialité :** Biotechnologie Microbienne

# *La détection d'*Escherichia coli* O157:H7 dans les denrées alimentaires et les carcasses bovines et ovines*

**Organisme d'accueil :**  
Institut Pasteur d'Alger, Dely Brahim

**Présenté par :**

*ABDOUN Selma*  
*AHMED ZOUAOUI Nour El Houda*

**Devant le jury :**

Mme GHOMARI Faiza Nawel	MAA	Présidente	U. Khemis Miliana
Mme AL AMIR Hanane	Dr.MR	Promotrice	Institut Pasteur d'Algérie
M. LAZALI Mohamed	Professeur	Co-Promoteur	U. Khemis Miliana
Mme DOUAOURI Nour El Houda	MCB	Examinatrice	U. Khemis Miliana
Mme SAIBI Nadjet		Invité	Institut Pasteur d'Algérie

**Année universitaire : 2021/2022**

# Remerciement

*Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Nos premiers remerciements s'adressent à madame **AL AMIR Hanane**, Docteur à l'Institut Pasteur d'Algérie. Qu'elle reçoive toute l'expression de notre reconnaissance pour nous avoir proposé ce sujet de recherche et son accueil au sein du Laboratoire, pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude. Qu'elle trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.*

*Nous tenons chaleureusement à remercier également notre Co-promoteur Monsieur le professeur **LAZALI Mohammed**. Qu'il reçoive toute l'expression de nos reconnaissances pour son encadrement, ses précieux conseils et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien ce projet. Nous le remercions aussi pour son aide à la réalisation de ce mémoire.*

*Nous sommes très sensibles envers Madame **GHOMARI Faiza Nawel**, qu'elle nous a fait l'honneur et le plaisir en acceptant la présidence de notre jury. Qu'elle reçoive ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*Madame **DOUAOURI Nour El Houda** pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice. Nous sommes reconnaissantes pour l'intérêt qu'elle est portée à ce travail et nous tenons à leur exprimer à cet égard nos sincères remerciements*

***Nous remercions ....***

*L'équipe de laboratoire de bactériologie alimentaire, d'eau et l'environnement de l'institut de pasteur d'Algérie pour leur aide et leur soutien durant la réalisation de ce travail :*

***Mme NADJAT** pour votre patience, votre soutien et l'ambiance dans laquelle nous avons pu travailler ces trois mois.*

***Mme AMINA** pour leur sympathie, leur aide technique et pour la bonne ambiance qui règne dans l'unité.*

*Un grand merci pour Mr Djamel, Mme Nora, Mr Karim, Dr Hamrouche, Mme Hadjer, Mme Amina, Mr Rachid, Dr Benidir.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à...*

*À ma mère*

*À mon cher père,*

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs*

*À ma chère grand-mère Houria*

*Mon Frère **Fateh Yacine** Rebi Yerahmou*

*Ma sœur **Oumaima**, mon frère **Chafik**.*

*Mes chères cousines : **Hadjer, Ikram et Lydia**.*

*Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études*

*Mes petits cousins et cousines*

*Ma chère binôme **Selma** pour son soutien morale et sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet*

*Mes oncles **Abd El Ghani, Mohamed, Abd El kader, Ilyes***

*Mes tentes **Hayat, Zahida, Naima, Rafika***

*Mes chères amies : **Rayane, Fatiha, Ghada, Imene, Wided, Maroua, Yasmine, Boutheyna, Ikram, Yasmine, Fifi, Sabrina, Asma, Farah, Chaima, Rayane, Ibtisseme, Tina, Meriem, Narimene, Warda, Djamilia, Rokia, Anfel**.*

*Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles*

*À chaque personne très chère à moi ...*

*À toute ma famille*

*Nour El Houda*

# *Dédicace*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à mes chers parents ; vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour.*

*À l'homme, mon précieux offre du dieu, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, tout mon respect : **mon cher père.***

*À la mémoire de ma mère, A la femme qu'elle m'a donné la vie et m'a quitté trop tôt, ALLAH yerhamhek **Maman.***

*Je dédie aussi ce travail à mes sœurs **Soumia et Halouma**, à mes frères : **Amine et Walid** à mes belles sœurs **Mizoula et Amira** pour leurs soutiens.*

*À mes neveux et mes nièces.*

***Adlane, Meriem, Hadia, Anes, Bassma, Mouad, Zayed, Ikram.***

*À mes chères cousines.*

*A la famille **CHERCHALI** pour leur accueil chaleureux pendant la période de stage.*

*À ma chère binôme « **Nour El Houda** » pour sa présence, sa sympathie et pour sa patience infinie durant toute la période d'étude.*

*À mes chères amies : **Sara, Yasmine, Ibtissem, Rayane, Imene, Wided, Ghada, Fatiha, Asma, Assala, Yousra, Maroua, Fifi, Sabrina, Chaima, Farah, Tina, Djamila, Rokia, Narimene, Meriem, Warda, Anfel, Lydia, Ikram** . Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.*

*À chaque personne très chère à moi ...*

*À toute ma famille.*

## Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxico-infections alimentaires conduisant à des colites hémorragiques pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique. Cependant, il existe aujourd'hui une réglementation officielle stipulant les procédures à suivre pour l'échantillonnage et la recherche des Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) dans les denrées alimentaires. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche des *E. coli* O157:H7 producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans 109 échantillons lesquels : les carcasses bovines et ovines, lait cru, et viande hachée. Nous avons suivi un protocole consistant en trois étapes : enrichissement, isolement, identification biochimiques et confirmation par test d'agglutination.

Après l'enrichissement et utilisation d'agents sélectifs qui ont pour but de freiner la croissance de la flore annexe, nous avons obtenus des différents souches à partir de viandes et d'autres à partir des écouvillons des carcasses bovines et ovines. Et nous n'avons pas détecté une présence d'*E. coli* O157:H7.

**Mot clés :** STEC, *E. coli* O157:H7, EHEC, SHU

## **Abstract**

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are responsible for food-borne toxins leading to haemorrhagic colitis which can be complicated by haemolytic uraemic syndrome. However, there are now official regulations stipulating procedures for sampling and testing for Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in foodstuffs. In this study, we investigated Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 (STEC) in 109 samples, including beef and sheep carcasses, raw milk, and minced meat. We followed a three-step protocol: enrichment, isolation, biochemical identification and confirmation by agglutination test.

After enrichment and the use of selective agents to inhibit the growth of the adventitious flora, we obtained different strains from meat and others from bovine and ovine carcass swabs. And we did not detect the presence of *E. coli* O157:H7.

**Key word:** STEC, *E. coli* O157:H7, EHEC, SHU

## ملخص

الإشريكية القولونية النزفية المعوية (EHEC) هي المسؤولة عن التسمم الغذائي الذي يؤدي إلى التهاب القولون النزفي الذي يمكن أن يكون معقدًا بسبب متلازمة انحلال الدم اليوريمي. ومع ذلك ، توجد الآن لوائح رسمية تنص على الإجراءات الواجب اتباعها لأخذ العينات والكشف عن الإشريكية القولونية المنتجة لسموم الشيغا (STEC) في المواد الغذائية. في هذه الدراسة ، كنا مهتمين بالبحث عن E. coli O157: H7 منتجي سموم الشيغا (STEC) في 109 عينة ، بما في ذلك: جثث الأبقار والأغنام ، والحليب الخام ، واللحوم المفرومة. اتبعنا بروتوكولاً يتكون من ثلاث خطوات: التخصيب والعزل وتحديد الكيمياء الحيوية والتأكد عن طريق اختبار التراص.

بعد تخصيب واستخدام عوامل انتقائية تهدف إلى إبطاء نمو النباتات الملحقة ، حصلنا على سلالات مختلفة من اللحوم وغيرها من مسحات من جثث الأبقار والأغنام. ولم نكتشف وجود بكتيريا الإشريكية القولونية O157: H7.

**الكلمات المفتاحية:** STEC, E.coli O157:H7, EHEC ,SHU

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : <i>E. coli</i> O157 :H7 en microscopie électronique.....	3
<b>Figure 2</b> : Sérogroupes des souches de STEC associés aux infections humaines.....	4
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de la relation entre <i>E. coli</i> O157 et STEC.....	5
<b>Figure 4</b> : Hiérarchisation des <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques.....	6
<b>Figure 5</b> : Lésions d'attachement-effacement induites par une souche <i>E. coli</i> O157:H7 sur des Cellules rectales de mouton.....	12
<b>Figure 6</b> : Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal.....	17
<b>Figure 7</b> : Évolution clinique de la colite hémorragique.....	18
<b>Figure 8</b> : Évolution d'un SHU.....	18
<b>Figure 9</b> : Évolutions cliniques après ingestion de STEC.....	20
<b>Figure 10</b> : points de prélèvement de carcasses bovines.....	27
<b>Figure 11</b> : test d'oxydase.....	30
<b>Figure 12</b> : réactif utilisés pour le test d'agglutination .....	32
<b>Figure 13</b> : Colonie d' <i>E. coli</i> sorbitol positif sur milieu CT-SMAC .....	35
<b>Figure 14</b> : colonie d' <i>E. coli</i> sorbitol négatif sur milieu CT-SMAC.....	35
<b>Figure 15</b> :Colonies d' <i>E. coli</i> fermentent le lactose sur milieu Hektoen.....	36
<b>Figure 16</b> : Aspect des colonies <i>E. coli</i> sorbitol négatif sur milieu Chromogène.....	36
<b>Figure 17</b> : Aspect des colonies d' <i>E. coli</i> sorbitol positif sur milieu Chromogène.....	37
<b>Figure 18</b> : Aspect des colonies de <i>Klebsiella</i> sur milieu Hektoen .....	37
<b>Figure 19</b> : Aspect des colonies de <i>Proteus</i> sur milieu Hektoen.....	37
<b>Figure 20</b> : Aspect des colonies de <i>Pseudomonas spp</i> sur milieuCT-SMAC.....	38
<b>Figure 21</b> : Disque oxydase.....	38
<b>Figure 22</b> : Résultat de test d'oxydase.....	38
<b>Figure 23</b> : Aspect de TSI après l'incubation.....	39
<b>Figure 24</b> : Aspect des colonies fermentent les 3 sucres sur milieu TSI (Glucose+, Lactose+, Saccharose+, GAZ+) .....	39
<b>Figure 25</b> : Aspect des colonies fermentent les 3 sucres et produisent de l'H <sub>2</sub> S sur milieu TSI(Glucose+, Lactose/Saccharose +, H <sub>2</sub> S+, GAZ+).....	40

<b>Figure 26</b> : Milieu urée- indole après l'incubation .....	40
<b>Figure 27</b> : Résultat d'urée négatif et la formation d'anneau rouge (indole positif) .....	41
<b>Figure 28</b> : Galerie API 20 E avant l'incubation.....	41
<b>Figure 29</b> : Aspect de <i>Citrobacter</i> Sur Galerie API20 E.....	41
<b>Figure 30</b> : Aspect de <i>E. coli</i> sur Galerie API20 E .....	42
<b>Figure 31</b> : Aspect des colonies non agglutinats le latex anti-O157.....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Taxonomie Escherichia coli O157:H7.....	3
<b>Tableau 2</b> : Principaux critères différentiels des espèces du genre Escherichia.....	7
<b>Tableau 3</b> : Principaux pathovars d'Escherichia coli impliqués dans les syndromes Diarrhéiques chez l'Homme.....	8
<b>Tableau 4</b> : Température de croissance d'E. coli O157 :H7.....	14
<b>Tableau 5</b> : Les plus importantes épidémies à E. coli O157:H7.....	19
<b>Tableau 6</b> : Le nombre de différents échantillons prélevés .....	27
<b>Tableau 7</b> : Résultats obtenus des échantillons analysés .....	34

## Liste d'Abréviation

- E .coli : *Escherichia. Coli* .
- Pseudo : *Pseudomonase. Sp* .
- Entro : *Entérobactérie* .
- Cytro: cytrobactérie.
- CT-SMAC: cefixime tellurite sorbitol MacConkey
- mTSB+N: Bouillon tryptone de soja modifié à la novobiocine.
- STEC: Shiga-Toxine *Escherichia. Coli*
- EHEC: E .coli entérohémorragique
- ETEC: *E. coli* entérotoxinogènes
- EPEC : *E. coli* entéropathogènes
- EIEC : *E. coli* entéro-invasives
- EAEC : *E. coli* enteroaggrégatives
- AIEC : *E. coli* adhérentes invasives
- *STX*: Les Shiga-like toxines
- CH : Colite hémorragique
- SHU : Syndrome hémolytique et urémique
- PTT : Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
- GN: Gélose nutritive.
- TSI : Triple Sugar Iran
- Lac : Lactose
- Sac : Saccharose
- Glu : Glucose
- MC : Mcfarland
- Ag : Antigène

# Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

## Synthèse bibliographique

### Chapitre 1

1. Historique d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	2
2. Taxonomie.....	3
3. Différents pathovars d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	8
4. Sources d' <i>E. coli</i> O157.....	11
5. Facteurs de virulence .....	12
6. Facteurs influençant la multiplication et la survie d' <i>E. coli</i> .....	13
6.1 Température .....	13
6.2 Congélation .....	14
6.3 Réfrigération .....	14

### Chapitre 2

1. Épidémiologie.....	15
2. Prévention .....	20
3. Traitement .....	21
4. Élaboration d'un vaccin humain contre <i>E. coli</i> O157 :H7.....	22

### Chapitre 3

9. Détection des <i>Escherichia coli</i> O157 .....	23
9.1 Méthodes microbiologiques.....	23
9.2 méthodes immunologiques .....	23
9.3 Méthodes génétiques .....	24

## Matériel et méthodes

1. Période et lieu d'expérimentation .....	26
2. Matériels utilisés .....	26
3. Échantillonnage .....	26
4. Méthode d'échantillonnage .....	28

5. Méthodologie .....	28
5.1 Enrichissement.....	28
5.2 Isolement sur CT-SMAC et Chromogène .....	29
5.3 Identification biochimique .....	30
5.4 Confirmation par Galerie API 20 E.....	31
5.5 Test immunologique .....	31

## **Résultats et discussion**

1. Résultats d'isolement .....	36
2. Résultats biochimiques .....	38
2.1 Recherche de l'oxydase .....	38
2.2 Test TSI.....	38
2.3 Production d'indole.....	40
2.4 Galerie API 20 E.....	41
3. Résultats immunologiques .....	42
4. Discussion .....	43
5. Conclusion .....	45
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>46</b>



# Introduction

Les aliments que nous consommons peuvent contenir des substances ou des agents pathogènes dangereux. Certains microorganismes représentent une menace potentielle pour la santé humaine et sont considérés comme les principales sources de maladies d'origine alimentaire. Parmi eux, nous avons *Escherichia coli* O157:H7 qu'elle a souvent été incriminé lors d'épidémies de colites hémorragiques et de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) (Caprioli et al., 2005). L'infection à O157:H7 peut revêtir plusieurs aspects, dont le plus fréquent est la colite hémorragique. Le tableau clinique peut cependant se compliquer d'un (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte. Le SHU et PTT ont en commun des lésions des cellules endothéliales de la microcirculation, suivies d'un gonflement cellulaire, d'adhérences plaquettaire et de thrombose. Les manifestations sont déterminées par le lit vasculaire le plus atteint : celui des reins dans le SHU, celui du cerveau dans le PTT.

Les STEC et plus particulièrement le sérotype O157:H7 représentent donc un danger potentiel pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agro-alimentaires. Or, en dépit des différents éléments soulignés dans les lignes précédentes, il existe à l'heure actuelle réglementation officielle stipulant les procédures à suivre pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans les denrées alimentaires. Ainsi, les divers protocoles de recherche utilisés actuellement dans les industries et les laboratoires de diagnostics varient principalement, d'une part, en fonction des procédures d'échantillonnage mises en place dans ces structures .et ,d'autre part, en fonction des protocoles d'enrichissement et méthodes de détection employés. Il se pose alors la question comment appliquer les méthodes de détection pour la recherche d'*E. coli* O157 dans les aliments ? Et cette bactérie existe-t-elle encore en Algérie ou bien elle est démunie de fermes ?

Dans notre étude, nous avons eu pour objectif de détecter la contamination de la carcasse ovine et bovine produite dans deux abattoirs d'EL Harrach et Miliana et dans les viandes hachée , Margez, viandes morceau et lait cru par les *Escherichia coli* O157. Pour ce faire, nous avons recherché la présence de ces souches à la surface des carcasses ovines et bovines, viandes hachées, Margez, lait de vache et de chèvre cru et tenté de confirmer la présence d'*Escherichia coli* O157 H7, grâce à différents tests d'identification. Ces étapes nous ont permis d'apprendre à utiliser les techniques microbiologiques, biochimiques et immunologiques pour ce type de pathogène.

## 1. Historique d'*Escherichia coli* O157 :H7

Il est difficile d'imaginer aujourd'hui l'excitation qui régnait à l'époque de Louis Pasteur (1822-1910) et Robert Koch (1843-1910), ou les médecins et les microbiologistes couraient après l'agent responsable de chaque maladie. C'est dans ce climat qu'un jeune pédiatre allemand, Theodor Escherich (1857-1911), décrivait, en 1885, l'espèce *bacterium coli commune*, isolée des selles de bébé nourris exclusivement au lait maternel. On sait aujourd'hui que cette entérobactérie s'installe dans l'intestin du nouveau-né rapidement après la naissance ; pendant un certain temps, elle constitue l'élément dominant de leur flore intestinale et elle reste présente chez l'adulte.

À l'époque, la mortalité infantile en Allemagne était élevée et des épidémies de diarrhée étaient fréquentes. Dans une démarche originale, Escherich examina les bactéries trouvées dans les intestins du nouveau-nés sains aussi bien que malades. Il trouva que le tractus intestinal, stérile à la naissance, était rapidement envahi par de nombreuses espèces de bactéries.

Isolé pour la première fois en 1982, L' *Escherichia coli* O157: H7, producteur de shigatoxines, est devenu un important agent pathogène d'origine alimentaire et hydrique qui provoque la diarrhée, la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'homme. Une souche bactérienne entérohémorragique, *E. coli* O157 : H7 infecte le tube digestif et induit des crampes abdominales avec diarrhée hémorragique. La transmission d' *E. coli* O157: H7 se produit par voie fécale-orale après consommation de liquides et d'aliments contaminés et insuffisamment cuits. Alternativement, *E. coli* O157: H7 peut être transmis de personne à personne par excrétion fécale et représente environ 11 % des infections. La production de toxines Shiga est un facteur clé contribuant au développement du SHU. Entérohémorragique *E. coli* O157 : H7 induit une maladie secondaire à sa production de toxine Shiga qui provoque une gamme de maladies gastro-intestinales, de la diarrhée aqueuse à la colite hémorragique. *E. coli* O157 : H7 induit une maladie entérohémorragique qui peut provoquer une maladie systémique par syndrome hémolytique et urémique, qui se manifeste par une anémie hémolytique, une thrombocytopenie et une insuffisance rénale aiguë. Le SHU peut entraîner à la fois une maladie aiguë, potentiellement mortelle, et une maladie chronique à vie.

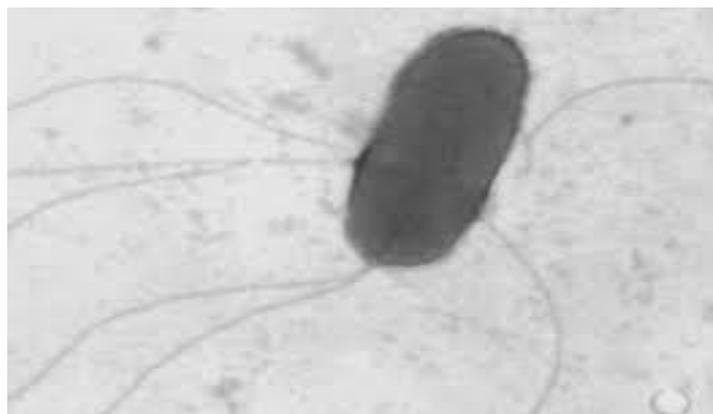
## 2. Taxonomie

Le terme *Entérobactériaceae* vient de deux mots grecs : Enteron « intestin » et baktéron « petit bâton », il signifie bacille intestinal. (Fauchère et al., 2002). La famille des Entérobactéries se définit par les caractères suivants (Le Minor et al., 1990) : bacille à gram négatif (2 à 4  $\mu$  de long sur 0.4 à 0.6  $\mu$  de large); immobiles ou mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche.

- poussent sur milieu ordinaire
- aérobies-anaérobies facultatifs
- réduisent le nitrate en nitrite
- ont une réaction d'oxydase négative
- utilise le glucose par voie fermentative

**Tableau 1** : Taxonomie d'*E. coli*

Domaine	Bactérie
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma –proteobacteria
Ordre	Enterobacteriale
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>
Sous espèce	<i>Escherichia coli</i> O 157



**Figure 1** : *E. coli* O157:H7 en microscopie électronique *E. coli* O157 :H7 en microscopie

électronique, isolé à partir de matériel d'abattoir (B.Andral – HSRV / Afssa lyon)

## 2.1 Diversité d'espèce *Escherichia coli*

Les *E. coli* O157 ne produisent pas tous des *Shiga-toxines* et ne sont donc pas tous des STEC. D'autre part, d'autres sérogroupes appartiennent aux STEC : *E. coli* O26, O45, O111, ... La relation entre STEC et O157 est représentée ci-contre L'identification des différents sérogroupes de STEC est attribuable à Kauffman, qui après s'être intéressé aux Salmonelles, s'est consacré aux *E. coli*. La classification des STEC en sérogroupes repose sur la définition de différents antigènes. Les travaux de Kauffman se sont basés sur l'étude de trois antigènes de surface : les antigènes somatiques **O**, les antigènes flagellaires **H** et les antigènes capsulaires **K**. Actuellement, on distingue 173 O, 103 K et 56 H.

- **Les Ag O** : sont des lipopolysides complexes de la membrane externe des *E. coli*. La spécificité antigénique est donnée par les séquences répétitives de polyoside. Nombre de ces antigènes O sont sérologiquement ou biochimiquement retrouvés chez d'autres organismes. C'est le cas entre *E. coli* et *Shigella*, confirmant les similitudes entre les deux taxons.
- **Les Ag K** : sont principalement des polyosides acides. Le typage des Ag K est rarement utilisé.
- **Les Ag H** : La diversité antigénique des flagelles dépend de la protéine de base, la flagelline. De nombreux *E. coli* sont peu ou pas mobiles si bien que ces antigènes sont assez difficiles à mettre en évidence. Quelques souches ne développent pas d'Ag H et sont dites non mobiles ou H $\emptyset$ .

50 sérogroupes ont été identifiés comme étant responsables de Colite Hémorragique ou de Syndrome Hémorragique et Urémique :

O2, O4 à O6, O9

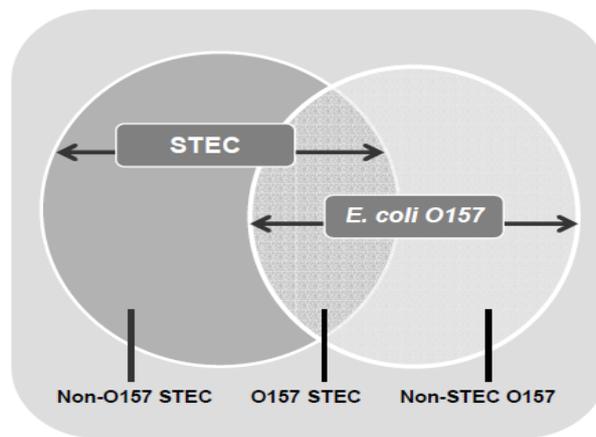
O18, O22, O26; O38, O45, O46, O48, O50, O55, O86, O91, O98

O103 à O105, O111 à 115

O117 à 119, O121, O125, O128, O145, O146, O153, O157, O163, O165, O168...

**Figure 2** : Sérogroupes des souches de STEC associés aux infections humaines. (D'après Loukiadis2002)

*E. coli* O157:H7 est le sérotype le plus répandu des *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC). Cependant, de nombreuses épidémies ont été attribuées à d'autres sérotypes et sont à inclure dans le groupe des STEC.



**Figure 3 :** Représentation schématique de la relation entre *E. coli* O157 et STEC: The prevention of *E. coli* O157 :H7-A shared responsibility (1999)

## 2.2 Habitat d'*Escherichia coli* O157

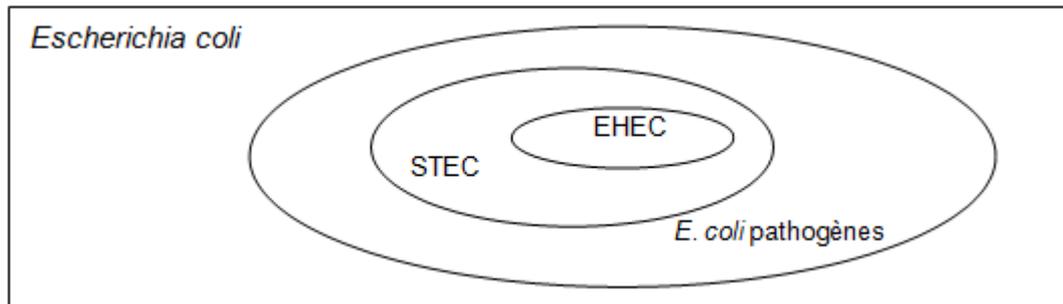
*E. coli* est un élément important de la flore intestinale des bébés humains. Chez l'adulte, lorsque l'intestin héberge une flore très variée, *E. coli* représente environ 1% des micro-organismes. À ce stade, il s'établit préférentiellement dans le colon, d'où son nom. *E. coli* vit également dans l'intestin de nombreux autres animaux : presque tous les mammifères, les oiseaux et les marsupiaux et même certains animaux à sang froid (poissons et reptiles). En fait, il semble capable de coloniser le tractus intestinal de la plupart des vertébrés. Partout, on trouve des variantes pathogènes et des variantes commensales, ces dernières étant bien plus fréquentes.

Chaque personne porte dans son tractus intestinal une population d'*E. coli*. Par conséquent, *E. coli* se trouve fatalement dans les égouts. Cette niche, si elle permet de répandre nombre de bactéries dans l'environnement puis vers d'autres animaux hôtes, ne semble pas propice à la propagation d'*E. coli*. Cela fait de cette bactérie un excellent indicateur de la présence de matière fécale dans les eaux.

Les bovins sont reconnus comme le principal réservoir d' *E. coli* O157:H7 entraînant une transmission zoonotique par la consommation de viande insuffisamment cuite ou de produits laitiers insuffisamment pasteurisés et contaminés par des matières fécales bovines ( Jay et al. , 2004 ; Kassenborg et al. , 2004 ). Ici, nous passons en revue les comportements environnementaux établis et putatifs d'*E. coli* O157:H7 et présentons des réservoirs potentiels et des niches écologiques où les EHEC peuvent persister dans l'environnement.

### 2.3 *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* O157:H7 produit des toxines de type Shiga et est classé dans les *E. coli* entérohémorragiques. La figure 4 présente la place des *E. coli* entérohémorragiques et donc d'*E. coli* O157:H7 parmi l'ensemble des *Escherichia coli*.



**Figure 4:** Hiérarchisation des *Escherichia coli* entérohémorragiques.

Ce sérotype fut le premier à être identifié comme responsable de diarrhées hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'homme au début des années 1980. Depuis, de nombreuses autres souches d'*E. coli* (toutes vérotoxino-gènes) ont été reconnues comme induisant les mêmes effets, mais *E. coli* O157:H7 reste la bactérie la plus étudiée et la mieux connue, étant le sérotype le plus souvent isolé lors de cas d'infections.

#### ✓ Caractères phénotypiques

Deux caractéristiques fondamentales différencient le sérotype O157:H7 des autres souches d'*E. coli* : 1) *Escherichia coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol en 24h à l'inverse des autres souches ; 2) Chez *Escherichia coli* O157:H7, l'enzyme b-glucuronidase n'est pas active.

Ces deux caractéristiques ont été utilisées pour mettre en place des techniques de détection d'*E. coli* O157:H7. Cependant, des souches mutantes d'*E. coli* O157:H7 fermentant le sorbitol ont été isolées (Feng, 1995).

*E. coli* O157:H7 semble génétiquement très proche du sérotype O55:H7 responsable de diarrhées infantiles (Mead et Griffin, 1998 ; Vernozy-Rozand et Montet, 2001). Par des transferts de gènes, *E. coli* O55:H7 aurait progressivement acquis les gènes *stx2* et *stx1* de production des toxines STX2 et STX1 et perdu la capacité à fermenter le sorbitol et l'activité de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase à la suite de l'infection par des bactériophages (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

#### ✓ Caractéristiques physiologiques

La croissance d'*E. coli* O157:H7 s'effectue entre 37 et 44°C. La bactérie présente une bonne résistance au froid (elle survit 10 à 31 jours à 8°C dans du cidre, Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

✓ **Caractéristiques biochimiques****Tableau 2** : Principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia* LIVRE*Escherichia coli* O157H Christine Vernozy\_Rozand Marie- Pierre Montet 2eme édition 2005

PAGE 4

	<b>E. coli non Entéro- hémorragique s</b>	<b>E .coli O 157 : H7</b>	<b>E. hermannii</b>	<b>E. vulneris</b>	<b>E. fergusonii</b>
Indole	+	+	+	-	+
pigment jaune	-	-	+		-
Lysine décarboxylase	+	+	-	+	+
Ornithine décarboxylase			+	-	+
B-xylosidase	-	-		+	-
B- glucuronidase	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+

**2.4 E. coli producteurs des toxines STEC**

Certaines souches sont productrices de toxines appelées vérotoxines (car elles infectent les cellules du rein du singe Vero) ou toxines de type Shiga (à cause de leur analogie avec les toxines produites par *Shigella dysenteriae*). Est appelée toxine toute substance protéique simple ou complexe, capable, à de très faibles doses, de provoquer la mort d'un organisme vivant ou d'induire in vivo ou in vitro des désordres pathologiques irréversibles ou réversibles au niveau des organes, tissus ou liquides biologiques d'un tel organisme (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

Ces souches d'*Escherichia coli* sont nommées VTEC (pour Verotoxin-producing *E. coli*) ou STEC (pour Shiga toxin-producing *E. coli*). L'emploi du terme STEC étant préconisé, nous l'utiliserons dans la suite du texte. En 1995, 60 sérotypes étaient recensés comme produisant effectivement

des toxines (Feng, 1995), ce nombre est maintenant passé à 100 (Coia, 1998 ; Law, 2000). Certains STEC sont pathogènes pour l'homme. On recense actuellement 50 sérotypes responsables de colites hémorragiques ou du syndrome hémolytique et urémique (Sutra et al., 1998). Les EHEC sont tous des STEC. Tous les STEC sont des bacilles fins de 0,5 µm de diamètre et de 2 à 3 µm de long. Ce sont des entérobactéries dont la coloration de Gram est négative et qui ne sporulent pas.

### 3. Différents pathovars d'*E. coli* O 157

#### 3.1 *E. coli* pathogènes intestinaux

Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinales (InPEC) peuvent être regroupées en six catégories :

- *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)
- *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC)
- *E. coli* entéro-invasives (EIEC)
- *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)
- *E. coli* enteroaggrégatives (EAEC)
- *E. coli* adhérentes invasives (AIEC)

**Tableau 3 :** Principaux pathovars d'*E. coli* impliqués dans les syndromes diarrhéiques chez l'Homme (Loukiadis 2002 (Milon 1993), Anonyme 2003)

Groupe	Propriétés caractéristiques des souches	Signes cliniques associés
<b>ETEC</b> ENTERO TOXIGENIC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhésion aux entérocytes par <i>fimbriae</i></li> <li>• Production d'entérotoxines ST et/ou LT</li> <li>• Sérovars humains typiques : O6 :H16, O8 :H9,</li> </ul>	Diarrhées aqueuses peu fébriles
<b>EIEC</b> ENTERO INVASIVE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmide de virulence</li> <li>• Invasion et prolifération dans les cellules épithéliales et en culture</li> </ul>	Dysenterie <ul style="list-style-type: none"> <li>• Syndrome fébrile</li> <li>• Ténésme</li> </ul>
<b>EPEC</b> ENTERO PATHOGENIC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de production d'entérotoxines LT et ST</li> <li>• Pas d'invasivité de type <i>Shigella</i></li> <li>• Attachement-effacement des microvillosités intestinales et destruction entérocytaire</li> <li>• Pas de production de toxines Shiga-like</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhées aqueuses prolongées</li> <li>• Fièvre</li> <li>• Vomissements</li> </ul>
<b>EHEC</b> ENTERO HAEMORRHAGIC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte production de toxine Shiga-like</li> <li>• Attachement-effacement des microvillosités intestinales</li> <li>• Sérovars typiques : <b>O157:H7</b>, O26:H11, O103:H2, O172:H ?</li> <li>• Plasmide de virulence d'environ 60 MDa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhées aqueuses profuses puis hémorragiques</li> <li>• Risque de SHU</li> </ul>

<b>EAEC</b> ENTERO AGGREGATIVE	Adhésines • Toxine thermosensible non hémolytique • Toxine thermorésistante EAST	• Diarrhées de plus de 15 jours
-----------------------------------	--	---------------------------------

✓ ***E. coli* entérotoxigène (ETEC)**

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), fréquemment associées à la "diarrhée du voyageur", sont des souches produisant des entérotoxines : toxine thermosensible (toxines LT), et/ou toxine thermostable (toxines ST). Lors de la colonisation de l'intestin, les entérotoxines provoquent la diarrhée. Les infections aux ETECs sont principalement trouvées chez les voyageurs, les nourrissons et les enfants dans les pays en voie de développement. Elles peuvent aussi être trouvées chez les animaux d'élevage (Nataro et *al.* 2004).

✓ ***E. coli* entéro-pathogène (EPEC)**

Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) provoquent, elles aussi, des diarrhées de type Persistantes. Toutefois elles ne produisent pas d'entérotoxine. Ces souches sont capables de s'attacher aux cellules intestinales et de réarranger le cytosquelette. Les EPECs provoquent principalement des gastro-entérites infantiles dans les pays développés ( Nataro et *al.*2004).

✓ ***E. coli* entéro-invasive (EIEC) :**

Les *E. coli* entéro-invasives (EIEC) provoquent des diarrhées aqueuses et parfois la dysenterie. L'infection se fait dans la muqueuse du colon, les bactéries l'envahissent et se multiplient de façon intracellulaire. Les EIECs sont similaires à la bactérie *Shigella* (Nataro et *al.* 2004).

✓ ***E. coli* entérohémorragique (EHEC)**

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont associées aux colites hémorragiques et au syndrome urémique hémolytique (HUS) provoqués par la production de Shigatoxines (Stx). Les EHECs peuvent aussi provoquer une défaillance rénale. Les toxines inhibent la synthèse des protéines et provoquent la mort cellulaire. Les EHECs sont surtout trouvées chez les enfants, mais aussi dans la flore normale bovine. Les EHECs provoquent ce qu'on appelle la "maladie du hamburger" (Kaper, Nataro et *al.* 2004).

✓ ***E. coli* enteroaggrégative (EAEC)**

Les *E. coli* enteroaggrégatives (EAEC) causent des diarrhées aiguës et persistantes chez les adultes et les enfants. Les EAECs sont présentes, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Les EAECs colonisent le colon et y sécrètent des entéro toxines et des cytotoxines (

Nataro et *al.* 2004).

✓ ***E. coli* adhérentes invasives (AIEC)**

Les *E. coli* adhérentes invasives sont majoritairement associées à la maladie de Crohn. Cette maladie est responsable d'infections importantes dans l'intestin. Les AIECs sont capables d'adhérer fortement aux cellules épithéliales de l'intestin et de les envahir. Le mécanisme impliqué dans ces actions consiste en la polymérisation de microtubules et le recrutement d'actine. L'action des bactéries induit une sécrétion inflammatoire de cytokine. Les AIECs sont aussi capables de survivre et de se répliquer dans des macrophages : ce qui induit une importante sécrétion de TNF- $\alpha$  (Agus, Massier et al. 2014).

### **3.2. *E. coli* pathogènes extra-intestinaux**

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), ne sont pas associés aux infections quand ces souches se trouvent dans le tractus intestinal. Cependant lorsqu'elles colonisent des tissus hors de l'intestin, elles peuvent causer des infections importantes (Johnson and Russo 2002).

#### **Les ExPECs peuvent être regroupées en quatre catégories**

- *E. coli* uropathogènes (UPEC)
- *E. coli* associées à la septicémie (SEPEC)
- *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC)
- *E. coli* pathogènes aviaires (APEC)

Les ExPECs possèdent une grande diversité de facteurs de virulence. Les ExPECs semblent avoir été créées par l'accumulation de certains facteurs de virulence dans des souches *E. coli* appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D (Johnson and Russo 2002).

## **4. Sources d'*E. coli* O157**

### **► Chez les bovins**

Ce n'est qu'à partir de 1982 après que deux épidémies de colites hémorragiques dues à une infection à *E. coli* O157:H7 aux Etats Unis dues à la consommation de hamburger qu'on commence à s'intéresser aux *E. coli* O157:H7 (Riley *et al.*, 1983). Les sources de *E. coli* O157 H7 sont avant tout les produits d'origine animale avec en premier lieu les steaks hachés de bœufs insuffisamment cuits (MacDonald *et al.*, 1988 ; Espié et Vaillant, 2003), les produits laitiers (les fromages au lait cru) les ovo-produits, mais également les produits d'origine végétale (cidre artisanal de pommes, laitues, pomme de terre, pousse de radis...) (Breuer *et al.*, 2001).

D'autres parts, le milieu extérieur représente une source importante, notamment par l'intermédiaire de l'eau (baignades en lac ou en patageoires contaminées par des matières fécales d'origine humaine, ou eau de boisson insuffisamment chlorées...).

Les bovins sont considérés comme étant les principaux réservoirs de souches STEC, en particulier de souches STEC O157. La présence de STEC chez les bovins a été démontrée dans le monde entier : Amérique (Etats-Unis, Brésil), Océanie (Australie), Asie (Japon, Inde), Afrique (Ouganda) et Europe. Les données disponibles sont nombreuses et varient selon les études et les sérotypes recherchés. Quant au seul sérotype O157, le pourcentage de bovins porteurs varie entre 0,2% (France) (Prad *et al.*, 2000) et 16,6% (Italie) (Caprioli, 1999) avec une moyenne de 4,1%.

#### ► Viandes bovines

*E. coli* O157:H7 et les autres STEC sont introduits dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. La contamination des carcasses peut avoir lieu principalement aux moments du dépouillement des cuirs (potentiellement souillés par le pathogène) et de l'éviscération (le pathogène ayant pour réservoir principal le tube digestif des bovins)

#### ► Lait et produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis plusieurs années. La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite, même si certaines études suggèrent l'existence possible d'une voie de contamination du lait avant la traite (Matthews *et al.*, 1997).

#### ► Végétaux

Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons, etc) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol.

#### ► Eau

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson (Mannix *et al.*, 2005), ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades ; Paunio *et al.*, 1999).

#### ► Transmission inter-humaine

La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection

au sein des familles (Ludwig *et al.*, 1998) et dans les hôpitaux (Karmali *et al.*, 1999; Bolduc *et al.*, 2004).

### ► Dans l'environnement

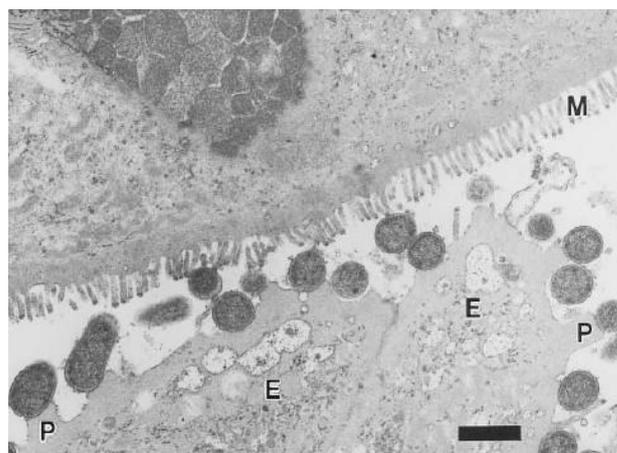
La contamination fécale est la principale source de contamination de l'environnement et l'apport régulier de STEC à travers les fèces des animaux est en partie responsable de la persistance de ces pathogènes dans l'environnement. Les ruminants et notamment les bovins sont considérés à l'heure actuelle comme le réservoir principal de *E. coli* O157:H7 (Andral *et al.*, 2000).

## 5. Facteurs de virulences

Deux facteurs de virulence majeure des STEC ont été identifiés : la présence d'une protéine responsable de l'adhésion des bactéries à la paroi intestinale de l'homme, mais aussi la production par les bactéries de toxines appelées aussi Shiga-Toxines. Cependant, il existe d'autres facteurs de virulence moins connus (Entérohémolysine, résistance à l'acidité...).

### 5.1 Facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion sont des éléments majeurs de la pathogénie. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de la membrane externe et des lipopolysaccharides. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de connaître les différents facteurs responsables de ce processus (Paton *et al.*, 1997).



**Figure 5 :** Lésions d'attachement-effacement induites par une souche *E. coli* O157:H7 sur des cellules rectales de mouton (Wales *et al.*, 2001)

### 5.2 Les Shiga-like toxines (*stx*)

Actuellement les principaux facteurs de virulence des EHEC sont les *stx* qui sont des cytotoxines inhibantes *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon

irréversible leur multiplication.

Les *Stxs* regroupent deux principaux types (Strockbine et al., 1986): Les *Stxs* de type 1 les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, (Takao et al., 1988); et les *Stxs* de type 2 qui présentent moins de 60% d'homologie avec la séquence en acides aminés des *Stx1*. Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires.

### 5.3 Facteurs plasmidique

Un nouveau phénotype hémolytique dû à l'entérohémolysine E-hlyA a été mis en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin et al., 1988). La protéine E-hlyA est codée par le gène *ehxA* de l'opéron plasmidique *ehxCABD* (Schmidt et al., 1995). C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines RTX (Repeats in Toxin). Son mécanisme d'action est comparable à celui de l' $\alpha$ -hémolysine. L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à sa capacité à former des pores, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules (Soloaga et al., 1999).

## 6. Facteurs qui influençant la multiplication et la survie d'*E. coli* O157 :H7

### 6.1 Température

Le taux de croissance augmente lorsque la température augmente. La température optimale est 37°C et la température maximale permettant le développement est 45°C selon Dolye et Schoeni (1984). Cet élément est d'importance quand on grand on garde en mémoire que le dénombrement des coliformes fécaux exige une incubation à 44°C. A cette température, la croissance d'*E. coli* O157 :H7 serait ralentie. Toutefois en milieu synthétique de laboratoire, la majeure partie des souches de STEC étudiées montre une température optimale de croissance ( $T_{opt}$ ) de 40°C (Gonthier et al., ; 2001 ; Nauta et Dufrenne, 1999), une température minimale de croissance ( $T_{min}$ ) de 6-7°C et une température maximale de croissance ( $T_{max}$ ) estimée à 45,5°C (Gonthier et al., 2001 ; Nauta et Dufrenne, 1999). Ainsi, le comportement de croissance des STEC vis-vis de la température est analogue à celui des *E. coli* en générale.

Tableau 4: Température de croissance d'*E. coli* O157:H7

Température minimale	Température optimale	Température maximale
6-7 °C	40°C	45.5°C

## 6.2. Congélation

On ne connaît actuellement que peu d'éléments concernant l'effet de la congélation sur *E. coli* O157:H7. Cependant, il apparaît que cette bactérie peut survivre à des températures inférieures à -80°C dans des viandes hachées de bœuf. La destruction cellulaire est très limitée lors d'un stockage pendant 9 mois à une température de -20°C (Dolye et Schoeni, 1984). Dans une autre étude, seulement 9 des 23 échantillons contenant *E. coli* O157:H7 ont été retrouvés positifs après 1 an de stockage à température de congélation (Milley et Sekla, 1993). Comme pour d'autres bactéries, l'intensité des lésions cellulaires ou la mort cellulaire générée par les températures négatives dépendent de la température de stockage et des éventuelles remontées en température.

## 6.3 Réfrigération

Les STEC peuvent se développer en laboratoire, à des températures de 6,5 à 7,2°C. Lorsque les autres conditions sont favorables à la multiplication du germe (Alcock, 1987 ; Davies et al., 1992 ; Elliott, 1963). La croissance dans les aliments a également été observée à des températures de l'ordre de 8°C dans des cidres de pommes non fermentés, ou à 12°C dans des cidres de pommes non fermentés. Les STEC peuvent survivre à des températures basses pendant de longues périodes. Une bonne réfrigération (inférieure à 5°C), devait empêcher la multiplication d'*E. coli* O157:H7. Toutefois le froid pourrait permettre la survie de cette bactérie lorsque les conditions de pH et les teneurs en NaCl sont défavorables à la croissance bactérienne (Zhao et al., 1993).

## 1. Épidémiologie

### 1.1 Modes de transmissions

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination des STEC. A l'heure actuelle, les 4 principales voies d'infection à EHEC sont l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission Inter humaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

#### ✓ Transmission alimentaire

La majorité des infections est le résultat d'une transmission alimentaire. En effet, un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié épidémiologiquement à la consommation de denrées animales (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts et al., 1995). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en Cause (Paton et al., 1996). De même, des produits végétaux contaminés et des produits laitiers ont été à l'origine d'épidémies (Miller et Kaspar, 1994). Pour certains aliments, l'hypothèse d'une contamination croisée avec de la viande de boeuf ou par l'utilisation d'ustensiles contaminés a été avancée. On peut également citer une contamination par simple contact avec les aliments (e.g. infection d'ouvriers au Royaume-Uni après contact avec des légumes crus contaminés (Morgan et al., 1988).

#### ✓ Transmission hydrique

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1997 et 2004, le système de surveillance des Etats-Unis rapportait que 6% des épidémies d'origine hydrique étaient liées aux EHEC (Blackburn *et al.*, 2004; Lianget *al.*, 2006) contre 3% au Royaume-Uni.

La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection (Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Mannix *et al.*, 2005). Depuis ces dix dernières années, le nombre d'épidémies associées aux réseaux publics d'eau potable a nettement diminué, notamment grâce à la mise en place de mesures préventives et curatives appropriées. Dans le cas des réservoirs d'eau dédiés à une consommation privée, ces mesures ne sont pas toujours appliquées. Du fait de leur insalubrité et de leur localisation (en aval de terres agricoles pâturées par des ruminants ou fertilisées par les effluents d'élevages), ces réservoirs d'eau peuvent être contaminés par les eaux de percolation et/ou de ruissellement,

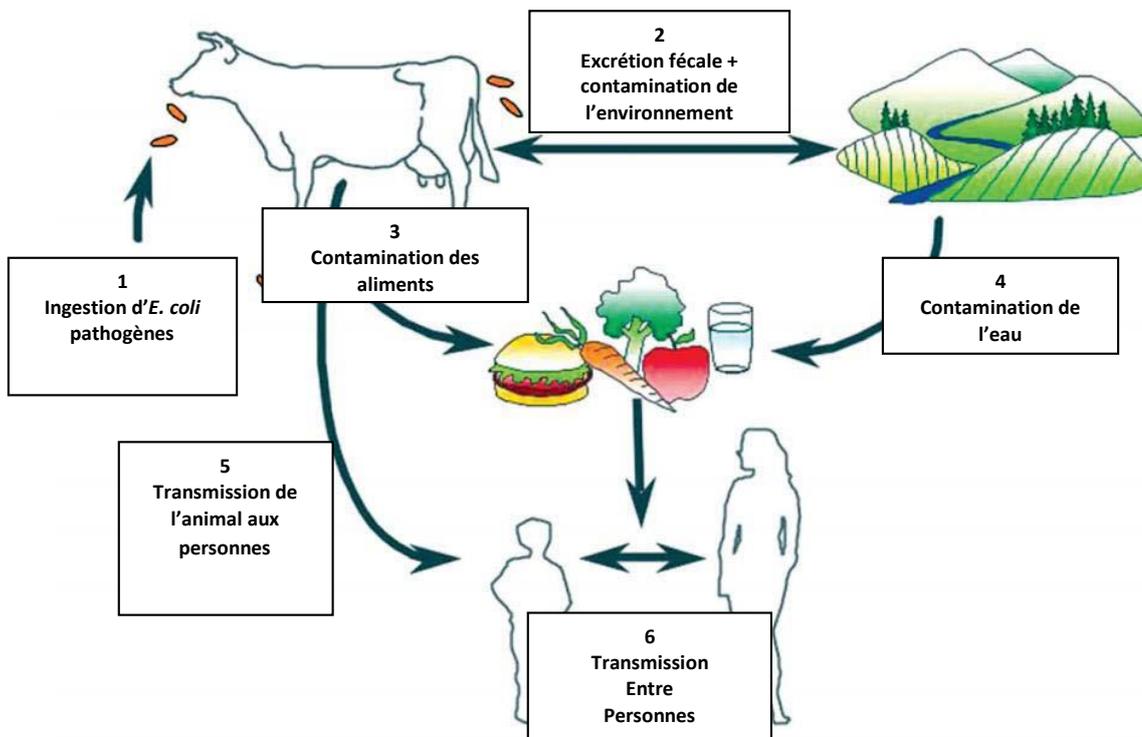
notamment à la suite d'importants événements pluvieux. Une enquête épidémiologique a pointée l'eau privée comme facteur de risque de contamination par les STEC (Chalmers et al., 2000). L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle ; Paunio et al., 1999) ou dans une piscine (Friedman et al., 1999) a souvent été incriminée. Aux Etats-Unis, les épidémies à *E. coli* O157:H7 d'origine hydrique sont principalement associées aux eaux issues de lacs ou rivières, en raison de la sensibilité des souches, notamment à la chloration des eaux de piscines (Craun et al., 2005).

### ✓ **Transmission inter-humaine**

De plus, cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Sugiyama et al., 2005), les centres de soins journaliers. La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors de colite hémorragique et de 31 jours lors de SHU (Karch et al., 1995).

### ✓ **Contact avec les animaux de ferme et leur environnement**

La transmission d'*E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques; O'Brien et al., 2001) mais aussi lors d'épidémies (Crump et al., 2002). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux (Evans et al., 2000). Par exemple, chez les éleveurs Anglais, la séroprévalence à O157 varie de 1,6% à 5% (Chalmers et al., 1999). Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals (Crampin et al., 1999) ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden et al., 2002). En Ecosse, du sol souillé a été impliqué dans 11% des infections environnementales à *E. coli* O157:H7 (Strachan et al., 2006).



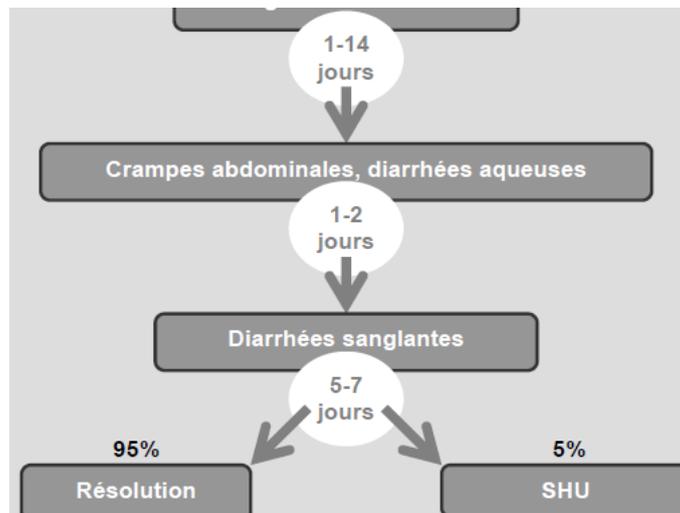
**Figure 6 :** Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal. (Fairbrother et *al.* (2006).

La transmission des EHEC par l'alimentation représente la principale source d'infection pour l'Homme. La transmission entre personnes qui peut être observée en milieu familial ainsi que le contact direct entre l'Homme et les animaux de la ferme constituent également des sources d'infection.

## 1.2 Principales épidémies

### ✓ Colite hémorragique (CH)

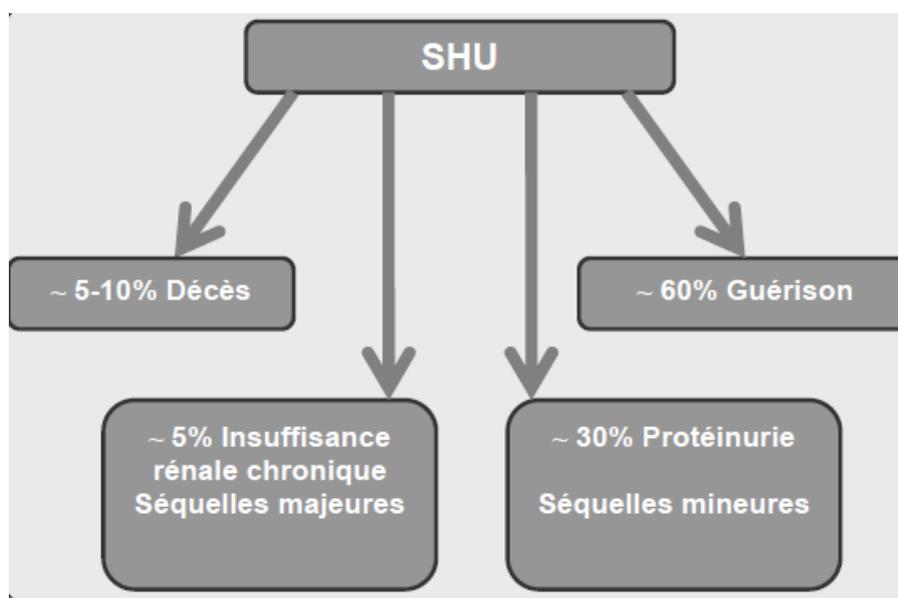
La colite hémorragique est la principale manifestation de l'infection à *Escherichia coli* O157:H7. (AFSSA 2003, Loukiadis 2002, USDA 1997, Coia 1998a). Elle est caractérisée par des crampes abdominales, une diarrhée aqueuse puis sanglante. Le sujet est le plus souvent apyrétique. La période d'incubation varie de 2 à 10 jours. La guérison spontanée est l'issue la plus fréquente. Des nausées et des vomissements accompagnent la diarrhée dans la moitié des cas.



**Figure 7 :** Évolution clinique de la colite hémorragique (The prevention of *E. coli* : a shared responsibility 1999 et rapport AFSSA 2003)

✓ **Syndrome Hémolytique et urémique (SHU)**

Le syndrome hémolytique et urémique a été décrit pour la première fois en 1955 par Gasser. Il touche principalement les enfants de moins de 3 ans, mais aussi les adultes et survient brutalement après un épisode de diarrhée sanglante. L’anémie hémolytique, la thrombocytopenie, l’oligo- ou l’anurie, l’insuffisance rénale aiguë caractérisent le SHU. Le SHU est la première cause d’insuffisance rénale aiguë chez l’enfant en Amérique du Nord et en Europe. La moitié des cas nécessite une dialyse et le taux de mortalité varie de 5 à 10%.



**Figure 8:** Evolution d'un SHU (The prevention of *E. coli*: a shared responsibility 1999 et rapport AFSSA 2003)

✓ **Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT)**

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925. Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et l'apparition de ce syndrome est récente (Kovacs et *al.*, 1990). Le PTT touche surtout l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. La diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993). Les prodromes diarrhéiques et émétiques sont plus rares que pour le SHU.

**Tableau 5** : Les plus importantes épidémies dues à *E. coli* O157

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nb de SHU+nb de décès)	Aliments suspectés ou confirmés
1982	Oregon-Michigan USA	O157:H7	46	Sandwich avec Viande de boeuf hachée
1984	Nebraska USA	O157:H7	34 (4décès)	Hamburger
1991	Canada	O157:H7	152 (22 SHU et 2 décès)	Viande de caribou et bœuf haché
1994	Washington-Californie USA	O157:H7	23 (2 SHU)	Salami sec
2000	Espagne	O157:H7	181 (6 SHU)	Saucisse
1997	Ecosse	O157 : H-	37	Gâteau à la crème
1998	Wisconsin USA	O157:H7	55	Fromage frais caillé
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé
2001	Colombie Britannique Canada	O157 :H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non Pasteurisé
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU et 3 décès)	Épinards

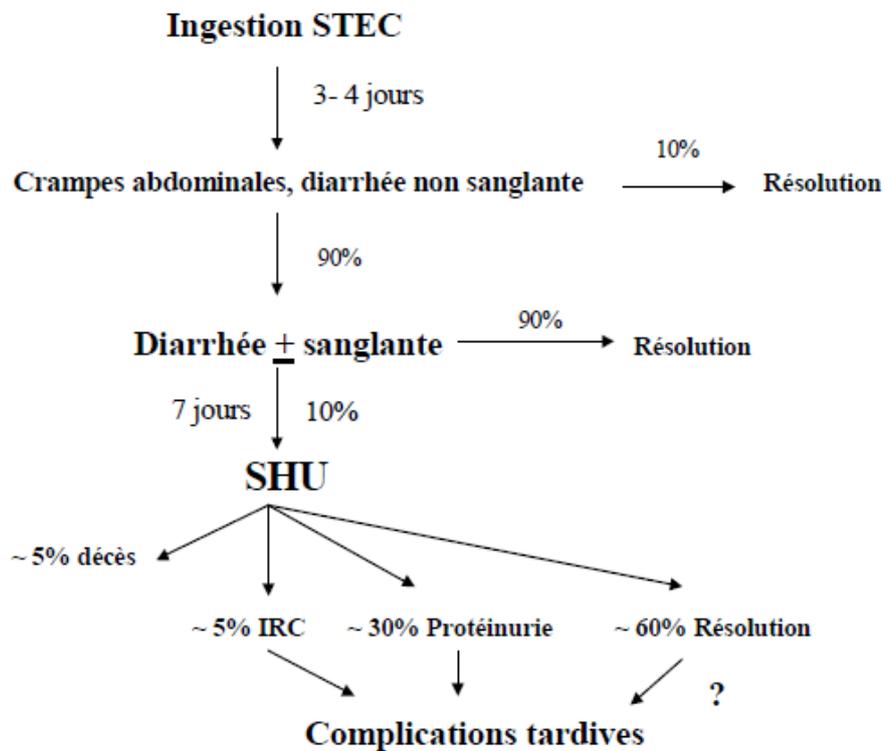
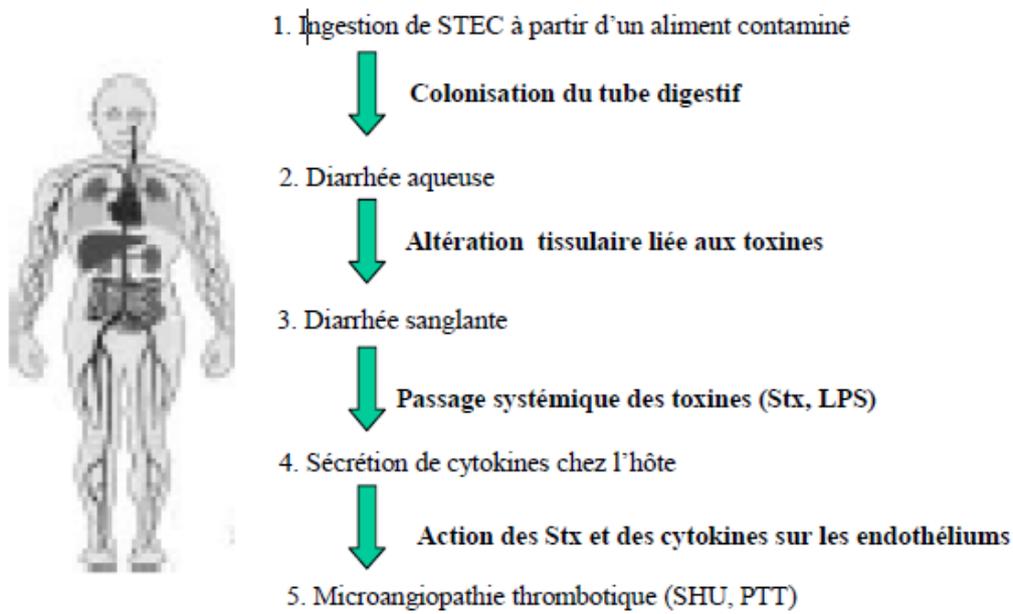


Figure 9 : Evolutions cliniques après ingestion de STEC (Heuvelink, 2000)

2. Prévention

Les mesures de gestion évoquées concernent l'ensemble de la chaîne alimentaire et varient en fonction de la sensibilité et des spécificités des pays (nombre de cas, législation, pratique agricoles).

Ces mesures n'ont pas de base législative qui soit spécifique des STEC. Toutefois, elles peuvent être utilisées dans un cadre plus général, à différents niveaux, et ainsi avoir un impact positif en termes de diminution du risque associé aux STEC. Quelques-unes de ces mesures sont citées ci-après :

- à la ferme, et plus particulièrement dans le cadre de visites de fermes, des mesures générales d'hygiène sont proposées.
- Lors du transport de l'animal à l'abattoir des mesures limitant les contaminations croisées peuvent être mis en place (camion à un seul étage, nettoyage des surfaces à chaque transport, limitation de la quantité d'aliments distribuée aux animaux avant le voyage, limitation du nombre d'arrêts afin de réduire le stress des animaux).
- à l'abattoir, l'animal ne doit pas arriver sale. Dans l'abattoir, diverses mesures spécifiques doivent également être prises : désinfection des couteaux, règles d'éviscération, élimination des animaux sales avant abattage.
- Au stade de la transformation et de la distribution, bien que la formation et l'éducation du personnel manipulant les denrées alimentaires soit fondamentale, elle semble insuffisante pour de nombreux pays. Afin de prévenir la contamination du lait cru dans les élevages, de grandes précautions doivent être prises lors de la traite des animaux laitiers (OMS, 2005).
- Un certain nombre d'infections à EHEC ont été associées à des baignades. Il est donc important de protéger ces zones aquatiques ainsi que les sources d'eau de boisson des déjections animales (OMS, 2005). Enfin, le développement de dispositifs d'épidémio-

Surveillance des infections à STEC pourrait permettre de prévenir la transmission des maladies, mais aussi de mieux connaître l'origine et les moyens de transmission des germes.

### 3. Traitement

Il n'existe pas de traitement spécifique et l'utilisation d'antibiotiques est contre-indiquée car la lyse des bactéries peut libérer plus de toxines et certaines études ont montré l'existence d'un risque accru de développer un SHU avec la prise d'antibiotiques chez des enfants. Le traitement est symptomatique. Si une infection à STEC est confirmée pour un patient chez qui une antibiothérapie empirique fut entamée, il est recommandé de l'arrêter. Le Haut Conseil de la Santé Publique en France s'est penché sur la question des antibiotiques en cas d'infection à STEC, notamment pour la problématique du portage asymptomatique. Il a des arguments en faveur de l'azithromycine à l'heure actuelle mais pas de haut niveau de preuve interdisant ou recommandant un traitement par cet

antibiotique. Si les vomissements, la diarrhée et les symptômes de colite persistent, une nutrition parentérale peut être nécessaire. En cas de SHU, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique a une importance capitale et permet de maintenir une létalité à moins de 5%. En cas d'anurie, une dialyse est indiquée pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volumique.

#### 4. Élaboration d'un vaccin humain contre *E. coli* O157 : H7

Trois facteurs prédominants doivent être pris en compte dans la conception d'un vaccin efficace :

- ✓ L'agent pathogène.
- ✓ La population ciblée.
- ✓ Le but de l'intervention.

Plusieurs voies d'élaboration du vaccin sont poursuivies, à savoir :

- ✓ Les vaccins vivants atténués.
- ✓ Les vaccins à cellules entières tuées.
- ✓ Les conjugués polysaccharide-protéine.
- ✓ Les vaccins à sous-unité de l'anatoxine *Stx*.

Les chercheurs de l'institut national pour la santé infantile et le développement humain aux Etats-Unis ont produit plusieurs vaccins candidats conjugués avec le polysaccharide O157 en faisant appel à l'exotoxine A (rEPA) de *Pseudomonas aeruginosa* produite par recombinaison génétique et la sous-unité B de *Stx1* comme supports protéiques (OMS, 1999). Cette approche repose sur la découverte que les vaccins efficaces contre *Vibrio cholerae* et *Shigella sonnei* entraînent la production d'IgG sériques anti-LPS en corrélation avec la protection. L'évaluation en phase 1 chez des volontaires adultes a été réalisée pour 3 vaccins comportant un LPS O157 détoxifié lié par covalence à la rEPA. Chacun d'entre eux a établi son innocuité et a induit la production d'anticorps spécifiques anti-O157 chez tous les vaccinés. Des recherches sont en cours de réalisation actuellement pour mettre au point des vaccins candidats conjugués comportant le LPS O157 et le LPS O111 détoxifiés liés par covalence à des supports consistants en holotoxines mutantes *Stx1* et *Stx2*. Il reste à évaluer si ces candidats se révéleront efficaces pour réduire la colonisation du bétail ou protéger l'homme de la maladie (OMS, 1999). Un chercheur japonais s'est efforcé à développer un vaccin à base de cellules entières d'*E. coli* O157:H7 irradiées au cobalt. Les bactéries exposées au cobalt-60 sont tuées mais restent mobiles et adhèrent aux cellules in vitro. L'évaluation d'un vaccin candidat chez l'animal à base de cellules entières d'*E. coli* O157:H7 irradiées au <sup>60</sup>Co n'est pas encore effectuée (OMS, 1999).

## 1. Détection des *E. coli* O157:H7

### 1.1 Méthodes microbiologiques

La détection d'*E. coli* O157:H7 dans les aliments peut être réalisée soit par la méthode classique de culture, soit par des méthodes dites alternatives. Toutes les méthodes actuellement disponibles ont été mises au point ou testées avec *E. coli* O157:H7. Les combinaisons entre les méthodes de bactériologie classiques et les méthodes alternatives sont nombreuses. Néanmoins, quelle que soit la combinaison retenue, le diagnostic de contamination d'un aliment par *E. coli* O157:H7 nécessite trois phases dont une indispensable, la phase d'enrichissement (Sutra *et al.* 1998).

#### *Culture bactériologique sur milieu sélectif*

Environ 93% d'*E. coli* O157:H7 ne fermentent pas le sorbitol en 24 h et sont  $\beta$ -glucuronidase négatives (Padhye et Doyle, 1992). Ces deux propriétés biochimiques sont utilisées afin d'isoler ce pathogène. La propriété sorbitol - est mise en évidence par l'addition à la gélose Mac Conkey du D-sorbitol sur laquelle les bactéries sorbitol + donnent des colonies roses à rouges, alors que les bactéries sorbitol - donnent des colonies blanches laiteuses. A partir de cette gélose de base qui est le Mac Conkey au sorbitol (SMAC), plusieurs autres milieux sélectifs ont été développés : Le milieu CT-SMAC qui en plus du sorbitol contient la cefixime et le tellurite, permettant ainsi d'augmenter la sélectivité en inhibant la croissance de la plupart des *E. coli* non O157:H7 (Zadik *et al.*, 1993).

### 1.2 Méthodes immunologiques

Tout comme la méthode microbiologique, les tests immunologiques de détection d'*E. coli* O157:H7 doivent être précédés par la phase d'enrichissement afin d'augmenter le nombre des bactéries susceptibles d'être isolées.

#### ✓ **Système ELISA**

Le test ELISA permet de donner les résultats en 2 heures. L'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposée dans des puits de microplaques où sont fixés des anticorps spécifiques d'*E. coli* O157. Après une incubation et une série de lavages, un anticorps révélateur anti-O157 est ajouté par la suite pour détecter éventuellement le couple « anticorps bactérie ». Cet anticorps est couplé à son tour à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique (AFSSA, 2003).

### ✓ Système automatisé

Le principe de la méthode immunologique complètement automatisée est le même que celui d'un système ELISA. Le kit comporte deux éléments prêts à l'emploi :

1. Un cône à usage unique servant à la fois de phase solide et de système de pipetage. Sa face interne est recouverte d'anticorps anti-O157.
2. Une barrette contenant les solutions de lavage et révélation.

Après une phase d'enrichissement de 24 heures, une aliquote de 500 µl du bouillon d'enrichissement est placée dans la barrette et subit des cycles d'aspiration-refoulement. Ainsi les bactéries *E. coli* O157:H7 présentes dans l'échantillon sont captées par les anticorps du cône. Les éléments restants sont éliminés grâce à plusieurs lavages. Des anticorps révélateurs anti-O157 marqués à la phosphatase alcaline, enzyme qui permet la révélation colorimétrique interprétée par l'appareil VIDAS, sont aspirés dans le cône en phase finale. Cet automate peut réaliser jusqu'à 30 analyses simultanément (Vernozy-Rozand et Montet, 2005).

### 1.3 Méthodes génétiques

Les méthodes génétiques permettent la détection des bactéries pathogènes présentes en très faible nombre dans l'aliment et pour lesquelles l'association de plusieurs facteurs de virulence est un pré-requis pour envisager le caractère éventuellement dangereux d'un aliment (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

#### ► Hybridation ADN et sondes oligonucléotidiques

Le principe de la méthode repose sur la propriété qu'ont les chaînes d'acides nucléiques simple brin de ne s'hybrider qu'avec des séquences de fragments complémentaires. La possibilité de cloner les gènes *stx1* et *stx2* a permis de développer des sondes ADN pour détecter les STEC. Initialement, ces sondes étaient marquées avec un isotope radioactif (30P ou 35S). Karch et Meyer, 1989, ont utilisé quatre oligonucléotides correspondant à quatre régions différentes du gène *stx1* et un oligonucléotide (41 bases) dérivé du gène *stx2* d'une souche d'*E. coli* O157:H7. Cette méthode d'hybridation sur colonie pourrait servir de test spécifique et sensible avec possibilité de diagnostic. Cependant, l'utilisation de sondes marquées radio-activement a posé de nombreux problèmes :

- ✓ Résultats obtenus après un temps trop long.
- ✓ temps de demi-vie court des sondes.

- ✓ Mais la mise au point de sondes non radioactives marquées à la digoxigénine ou à la biotine (révélation par une réaction enzymatique colorée) a réglé les problèmes rencontrés (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

### ► PCR

L'utilisation de la PCR pour détecter les STEC s'est développée ces dernières années. Grâce à cette technique, l'ADN est amplifié à un niveau suffisant même si le nombre des bactéries dans l'échantillon est très faible.

Le principe de la PCR est le suivant :

- L'ADN double brin est dénaturé par chauffage.
- Deux oligonucléotides utilisés par la polymérase comme amorce sont hybridés sur chacun des chaînes ; ils délimitent ainsi la portion d'ADN à amplifier.
- La polymérase synthétise la portion complémentaire depuis l'extrémité 3'OH des amorces.
- A partir d'une séquence d'ADN, on obtient donc deux strictement identiques.
- Le processus est répété plusieurs dizaines de fois (jusqu'à 40 fois).

Le premier système a été mis au point par Karch et Meyer avec des amorces « dégénérées », c'est à dire un mélange de plusieurs amorces permettant d'amplifier les gènes *stx1* et *stx2* (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000). Les amplifiants obtenus étaient identifiés par hybridation avec des sondes spécifiques complémentaires d'une partie de la séquence amplifiée. Il était alors possible d'identifier les séquences de *stx1* et *stx2*. Pour détecter tous les types de STEC isolés chez l'animal ou dans les aliments, Read et al, (1992) ont développé une PCR avec des paires d'amorces ayant pour cible une séquence conservée des gènes *stx1*, *stx2* et *stx2e*. Les gènes *uidA* codant la  $\beta$ -glucuronidase, *eae* codant l'intimine responsable de l'attachement de la bactérie aux entérocytes et le gène *flic* codant la flagelline, protéine constitutive du flagelle, peuvent être détectés seuls ou en combinaison avec les gènes *stx* (PCR multiplex).

## **1. Période et lieu d'expérimentation**

Notre étude sur la recherche d'*E. coli* O157 dans les aliments a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie des aliments et des eaux et de l'environnement à l'Institut Pasteur d'Algérie du 06 Mars au 15 Juin 2022.

Nous avons eu pour objectif de détecter la contamination de la carcasse ovine et bovine produite dans deux abattoirs d'EL Harrach et Miliana et dans les viandes hachées, Margez, viandes morceau et lait cru par les *Escherichia coli* O157. Pour ce faire, nous avons recherché la présence de ces souches à la surface des carcasses ovines et bovines, viandes hachées, Margez, lait de vache et de chèvre cru et tenté de confirmer, grâce à différents tests d'identification. Ces étapes nous ont permis d'apprendre à utiliser les techniques microbiologiques, biochimiques et immunologiques pour ce type de pathogène

L'institut Pasteur d'Alger fut créé en 1894, à l'initiative des Docteurs Jean Baptiste Paulin TROLARD et H. SOULIE. Cet institut fait partie actuellement du Pasteur Network (PN), dont la coordination est assurée par l'institut Pasteur de Paris. Leur objectif commun a élaboré un programme de coopération scientifique notamment pour la protection de la santé publique, en particulier pour la surveillance et le contrôle épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires (Sida, grippe, tuberculose, paludisme, choléra ...) ainsi, la participation aux grands programmes internationaux ou régionaux de recherche.

## **2. Matériels utilisés**

Les matériels utilisés sont montrés dans( l'annexe 1)

## **3. Échantillonnage**

Notre étude a concerné 109 prélèvements alimentaires comprenant à la fois des aliments crus, (viandes hachées, Margez, viandes morceau) provenant de plusieurs points de vente d'Alger et Ain Defla , lait de chèvre et de vache cru provenant de deux fermes et des écouvillons des carcasses bovines et ovines provenant de deux abattoir d'El Harrach et de Milian . Les échantillons étaient prélevés et transportés au laboratoire dans une glacière contenant un nombre suffisant de poche de glace. Les unités d'échantillonnage ont été conservées au réfrigérateur (4°C et 10°C) et analysées dans les 24 heures.

Tableau 06 : Nombre des différents échantillons prélevés

Nature d'échantillons	Écouvillons des carcasses		Viande hachée	Mergaz	Viands Marceau	Lait cru		Total
	Bovines	Ovines				Chèvre	Vache	
Nombre	50	20	16	7	4	1	10	109

L'échantillonnage a été réalisé au sein de deux abattoirs de la wilaya d'Alger et Ain Defla, l'abattoir de Miliana et celui d'El Harrach. Dix carcasses ont été écouvillonnées une fois par semaine de manière aléatoire, généralement début de la journée à 7 :00 du matin. Ces prélèvements ont été réalisés sur des carcasses bovines et ovines suspendues, après les opérations de saignée, d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique. Le nombre total des échantillons s'est élevé à 70 (34 écouvillons ont été prélevés au niveau de l'abattoir de Miliana).

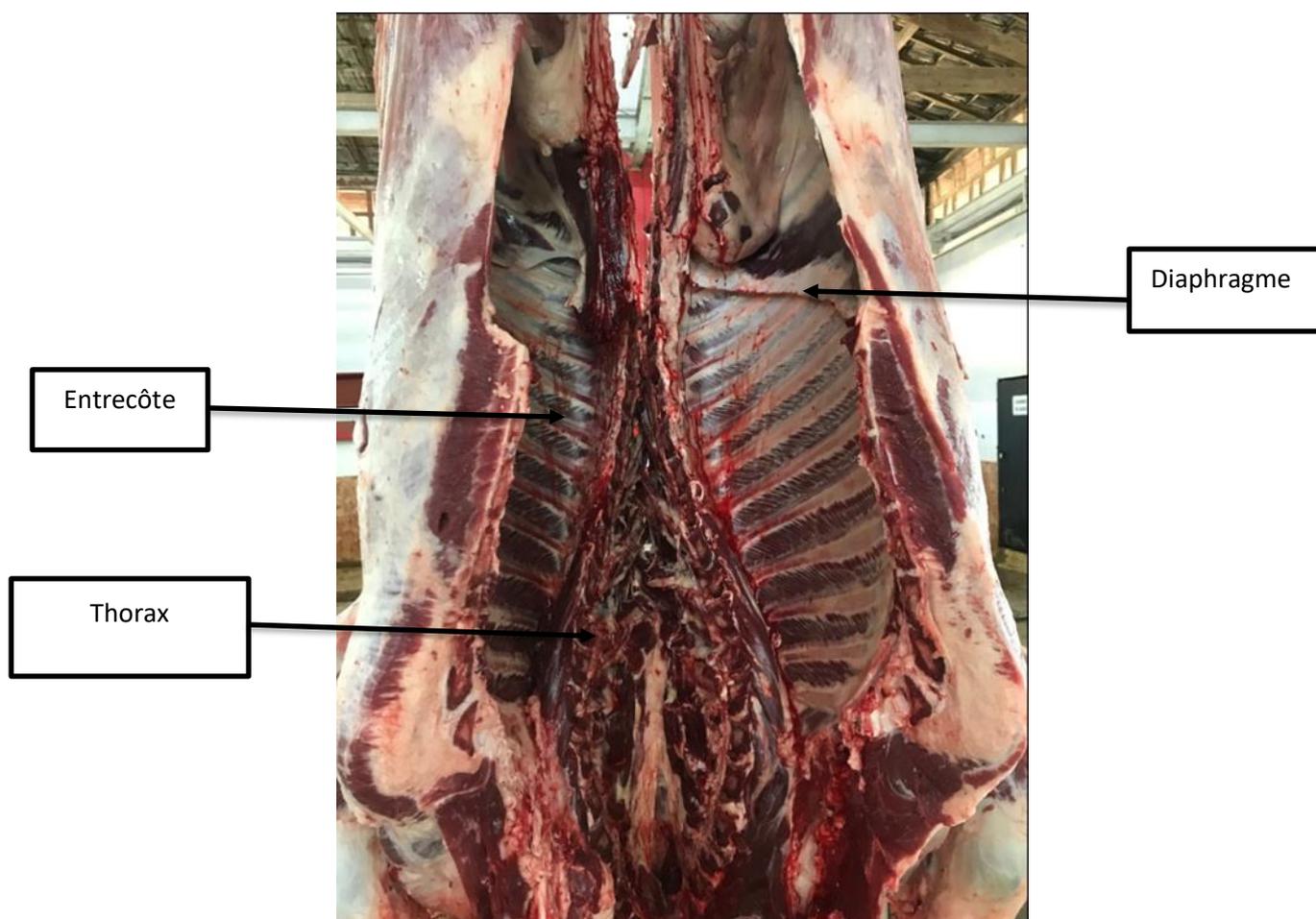


Figure 10 : points de prélèvement de carcasses bovines.

### 3.1. Méthode d'échantillonnage

Ces sites sont considérés comme les plus représentatifs de la contamination fécale des carcasses lors des différentes opérations d'abattage. Les photos suivantes montrent les zones qui ont été écouvillonnées après les étapes d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique. Afin d'éviter les contaminations croisées entre les carcasses écouvillonnées, des gants à usage unique ont servi à la réalisation de chaque échantillon.

La technique d'écouvillonnage est réalisée selon la procédure suivante :

- ✓ Pour chaque site, prendre un écouvillon stérile et l'imbiber avec une solution de Bouillon tryptone de soja + Novobiocine.
- ✓ Frotter en exerçant une pression aussi forte que possible avec l'écouvillon la zone de la carcasse délimitée d'abord verticalement puis horizontalement et enfin en diagonale, et ce pendant 20 secondes.
- ✓ Mettre les écouvillons dans des tubes de TSB+N déjà préparé au niveau de laboratoire.
- ✓ Acheminer les échantillons vers le laboratoire dans une glacière, puis les conserver à +4°C jusqu'à l'analyse qui doit être effectuée dans les 24 heures qui suivent.

## 4. Méthodologie

La recherche d'*E. coli* O157 :H7 nécessite une étape d'enrichissement, une étape d'isolement et une étape de confirmation selon la norme internationale **ISO 16654:2001**

### 4.1 Enrichissement

L'enrichissement est une étape importante en microbiologie alimentaire. En effet, la plupart des méthodes de détection utilisées à l'heure actuelle nécessitent une étape d'enrichissement, étant donné les faibles niveaux de contamination retrouvés dans les échantillons environnementaux ou alimentaires. L'objectif de l'étape d'enrichissement est de permettre la croissance des STEC au-delà du seuil permettant leur détection, tout en défavorisant au maximum le développement de la microflore annexe. L'étape d'enrichissement consiste à prélever une quantité donnée d'aliment, on parle alors de prise d'essai. À cette prise d'essai est ajouté un bouillon d'enrichissement. Ce mélange est ensuite incubé à la température optimum de croissance des bactéries cibles pendant une certaine durée. La température et le temps d'incubation varient en fonction de la bactérie recherchée.

► **Pour lait cru** : nous avons prélevé 25ml de lait de vache ou chèvre cru à l'aide d'une pro pipette dans 225 ml de TSB+N. Incubation à 44°C pendant 24 heures.

► **Pour viandes hachée, viande morceaux et Margez** : à l'aide d'une spatule stérile nous avons mis 25gr de viande dans un sac stérile plus un peu de TSB+N pour faciliter l'homogénéisation dans le

stomacher puis nous avons versé le tout dans un flacon contenant le milieu d'enrichissement (TSB+N). Incubation à 44°C pendant 24 heures.

► **Pour les écouvillons** : Nous avons mis les écouvillons prélevés dans TSB+N ou BHIB directement à l'incubation 44°C pendant 24 heures

## **4.2 Isolement sur CT-SMAC et Chromogène**

### **✓ Principe de milieu CT-SMAC**

La gélose de Mac Conkey au sorbitol est recommandée pour la recherche *Escherichia coli* O157 :H7. La composition est identique de celle de la gélose de Mac Conkey mais le lactose a été remplacé par du sorbitol. *E. coli* O157 ne fermente pas le sorbitol et produit donc des colonies incolores, alors que la plupart des autres souches d'*E. coli* le fermentent donnent des colonies roses.

### **✓ Principe de milieu Chromogène**

Le milieu chromogène *E. coli* est une gélose différentielle donnant une identification présomptive des *E. coli* et des coliformes dans les échantillons alimentaires et de l'environnement. La gélose utilise 2 substrat enzymatique afin d'améliorer la différenciation entre *E. coli* et les autres coliformes. Un chromogène permet la détection scientifique d'*E. coli* par la formation de colonies de couleur pourpre. Ce substrat est coupé par l'enzyme glucuronidase qui est produite par approximativement 97% des souches d'*E. coli*.

Pour tous les échantillons (écouvillons, viande hachée, viande morceau, Margez et lait cru) l'isolement se fait de même méthode :

- 1- Auprès du bec nous avons prélevé stérilement à l'aide d'une pipette pasteur une goutte de suspension enrichit et l'ensemencé sur CT-SMAC et sur Chromogène par des stries serrés.
- 2- Incubation des boites à 44°C pendant 24 heures pour CT-SMAC et à 37°C pendant 24 heures pour Chromogène.

## **4.3 Identification biochimique**

L'identification et la classification des entérobactéries sont basées essentiellement sur l'étude des caractères cités ci-dessous, dont les principaux concernent, l'utilisation des sucres (dont particulièrement le lactose). Après avoir des colonies sorbitol négatives qui sont transparente sur CT-SMAC et rose clair sur Chromogène on passe vers les tests biochimiques. Il faut savoir que toutes les entérobactéries sont oxydase négative. Nous avons repiqué les colonies qui ont une oxydase négative sur Triple Sugar Iron, Gélose Nutritif incliné et dans milieu urée indole.

**a) Recherche de l'oxydase**

Le teste de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négatif qui produisent cette enzyme. Le disque de papier filtre imprégné de réactif l'oxalate de N-dimethyl paraphenylène diamine, qui est incolore sous forme réduite et rouge-violet sous forme oxydée a été utilisé. Prélever une partie de la colonie à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque si on a une coloration bleu foncé à violette le résultat est positif se signifie l'oxydation de l'enzyme et l'absence de coloration indique la non oxydation de l'enzyme.



**Figure 11** : test oxydase sur disque dry slide

**b) Test TSI**

Le TSI est utilisé principalement pour orienter l'identification des entérobactéries (bacilles à Gram - ). Il permet en 24 heures la lecture des tests suivants : les fermentations du glucose, du lactose et du saccharose, la production d'H<sub>2</sub>S et de gaz provenant de la fermentation du glucose. Ensemencer la pente en stries serrées et le culot du milieu par piqure centrale, afin d'avoir une culture en nappe avec la souche bactérienne à tester. Ne pas revisser à fond le bouchon du tube. Incubation à 37°C pendant 24 heures.

**c) Production d'indole**

Le milieu urée-tryptophane, appelé urée-indole est un milieu de culture synthétique utilisé en bactériologie permettant la mise en évidence simultanée : i) de la production de l'indole (par hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase) ; ii) de l'hydrolyse de l'urée (par une uréase) ; iii) de la désamination du tryptophane par le tryptophane désaminase ; iv) ensemencer abondamment un milieu urée-indole avec quelques colonies de la souche à étudier, nous avons mis dans un bain marie 44°C pendant 30min l'urée avec un témoin négatif. Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

#### 4.4 Confirmation par Galerie API 20 E

**Galerie API** (analytical profile index) est une galerie miniaturisée et standardisée de **tests biochimiques**, exploitable avec des bases de données d'identification complètes dont la plus connue est l'**api 20E** (20 caractères pour les entérobactéries).

Nous avons fait la Galerie API 20 E pour la confirmation des *E. coli* : préparer une suspension bactérienne de 0.5 MC mesuré par un densimètre dans 5 ml d'eau physiologique, puis nous avons mis de l'eau distillé stérile dans les alvéoles de la galerie, ensuite nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur la suspension bactérienne et remplir les cupules de la galerie, enfin nous avons mis l'huile de vaseline et incubé à 37 °C pendant 24 heures.

#### 4.5 Test immunologique

Wellcolex *E. coli* O157 est un test rapide d'agglutination au latex pour l'identification confirmative des isolats *E. coli* O157 sur des milieux de culture en laboratoire.

##### *Principe de la méthode*

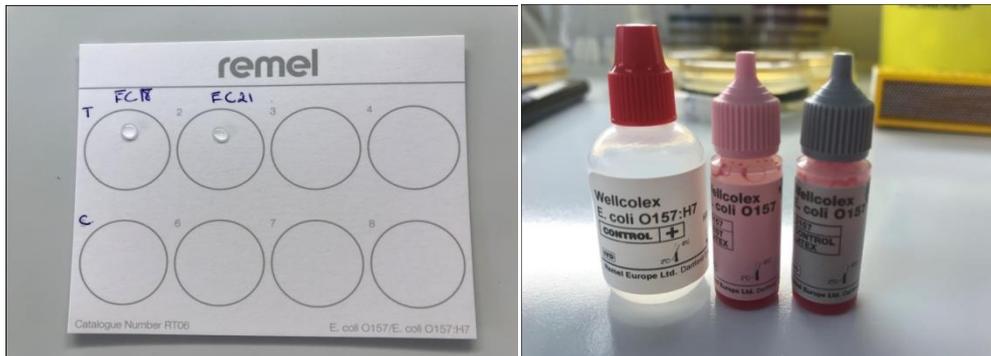
Le réactif test Wellcolex *E. coli* O157 est constitué de particule de latex rouge recouvertes d'anticorps spécifiques d'*E. coli* O157. Quand une goutte de réactif est mélangée avec une suspension d'organismes *E. coli* sur une carte de réaction, une agglutination rapide apparaît du fait de l'interaction entre les Igg spécifiques et les antigènes lipopolysaccharides O157.

##### *Procédure de test*

- ✓ Homogénéisé les réactifs au latex.
- ✓ Pour chaque échantillon, ajouter une goutte de latex test dans un cercle et une goutte de latex dans l'autre cercle.
- ✓ Mélanger le contenu de chaque cercle en étalant soigneusement le latex sur toute la surface du cercle.
- ✓ Faire doucement osciller la carte pendant 30 secondes et observer l'apparition éventuelle d'une agglutination.

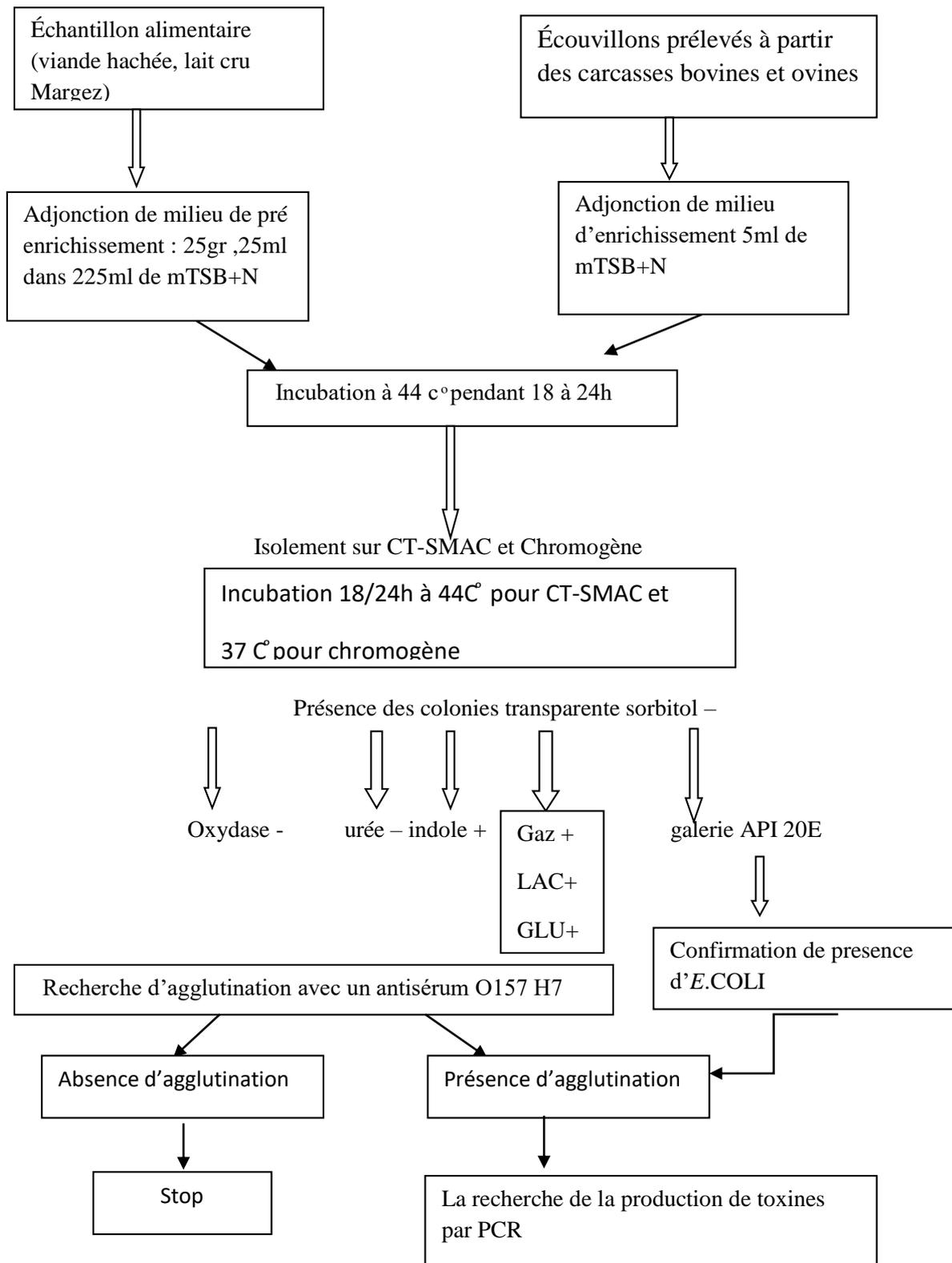
**Résultats positifs** : une agglutination du latex test accompagnée d'une absence d'agglutination du latex témoin indique la présence d'antigène O157 dans la culture testée, lorsque les antigènes *E. coli* O157 sont identifiés, les cultures doivent être également testée pour l'antigène H7 et/ou la production de vérotoxines.

**Résultat négatif** : une absence d'agglutination dans les deux réactifs signifiés que la culture analysée n'est pas de l'espèce d'*E. coli* O157. Une réaction négative n'exclut pas la présence possible d'*E. coli* O157 en faible quantité dans l'échantillon



**Figure 12** : Réactifs utilisés pour le teste d'agglutination

**Protocole de la recherche d'*E. coli* O157 dans l'aliment :**



Dans notre travail nous avons 109 d'échantillons prélevés à partir des carcasses ovines et bovines, viandes hachée, viandes morceau, merguez et lait de vache et de chèvre cru et. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus :

**Tableau 7 : Résultats obtenus des échantillons analysés**

**Pour 27 échantillons de viandes hachées, merguez et viandes en morceau :**

<b>Nombre d'échantillons (viandes hachée)</b>	5	2	2	1	6
<b>Souches obtenus</b>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Cytrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Entérobacterie</i>

<b>Nombre d'échantillons (viandes morceau)</b>	2	1
<b>Souches obtenus</b>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>

<b>Nombre d'échantillons (margez)</b>	1	5	2
<b>Souches obtenus</b>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Entérobacterie</i>

**Pour 70 écouvillons prélevés à partir des carcasses bovines et ovines :**

<b>Nombre d'écouvillons Des carcasses bovines</b>	13	20	13	1	2	1
<b>Souches obtenus</b>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Entérobacterie</i>	<i>Cytrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>

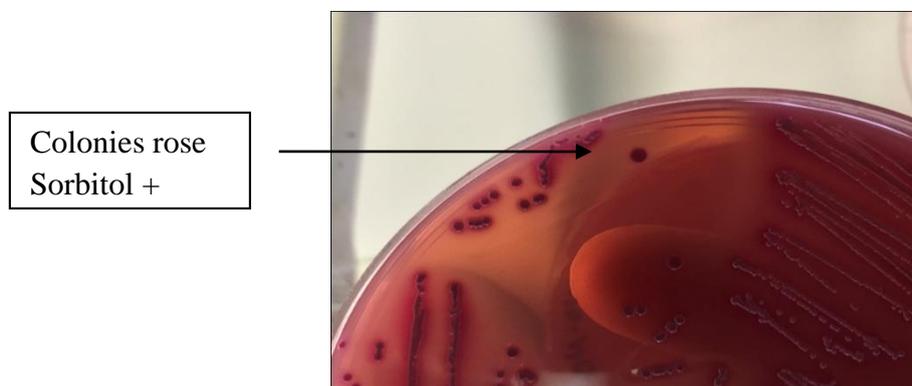
Nombre d'écouvillons Des carcasses ovines	2	5	13
Souches obtenus	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonass spp</i>	<i>Entérobacterie</i>

Pour 12 échantillons de lait de vache et chèvre cru :

Nombre de lait de vache et de chèvre cru	Vache	Vache	Chèvre	Vache
	1	9	1	1
Souches obtenus	<i>E. coli</i>	<i>Entérobacterie</i>		<i>cytrobacter</i>

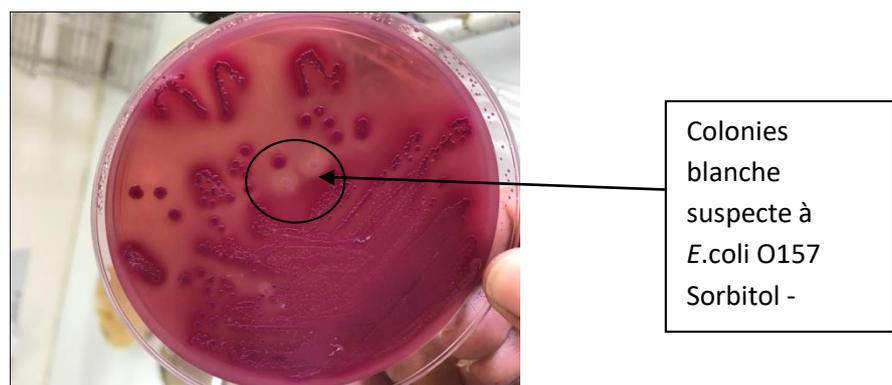
### 1. Résultats d'isolement

La figure suivante montre l'aspect des colonies d'*E.coli* de couleur de rose fuchsia, brillante avec un contour régulier elle fermente le sorbitol (positif) sur gélose CT-SMAC



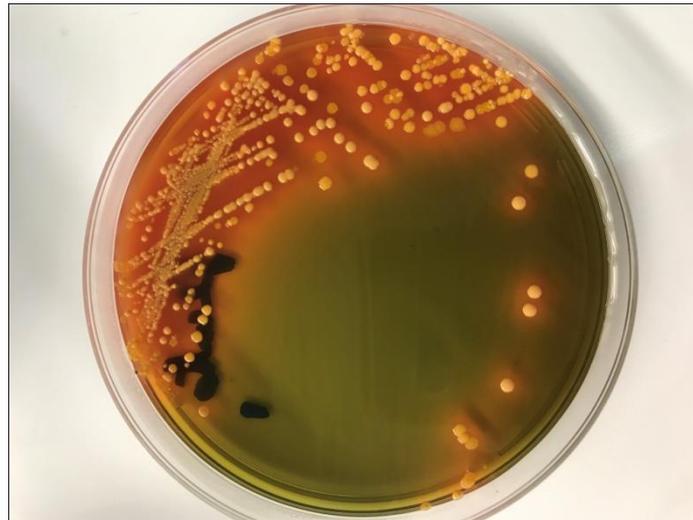
**Figure 13:** Colonie d'*E. coli* sorbitol positif sur les milieu CT-SMAC

La figure suivante montre l'aspect des colonies suspectes à *E. coli* O157 qui sont blanche , grosse et elles ne fermentent pas le sorbitol (négatif ) sur gélose CT-SMAC.



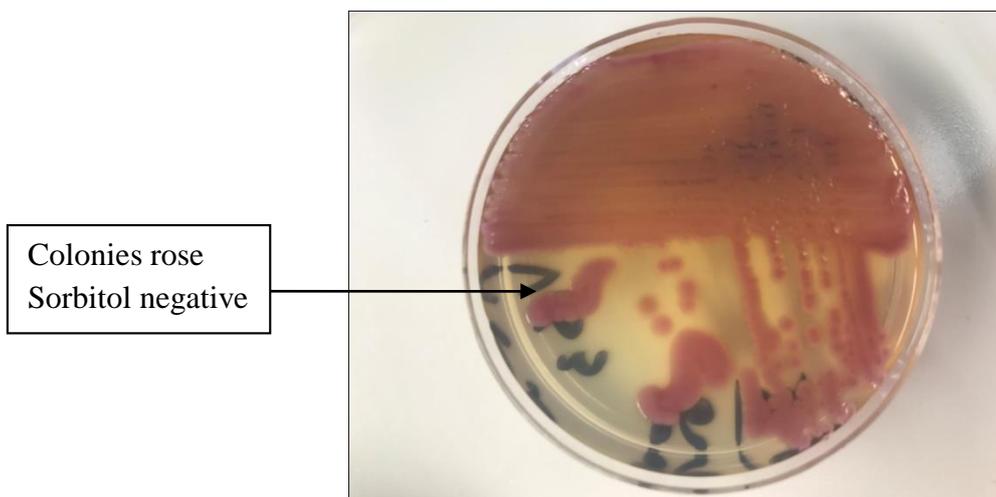
**Figure 14 :** Colonie d'*E. coli* sorbitol négatif sur milieu CT-SMAC

La figure suivante montre l'aspect des colonies d'*E. coli* qu'elles fermentent le lactose et donnent un aspect fluorescent sur gélose Hektoen.



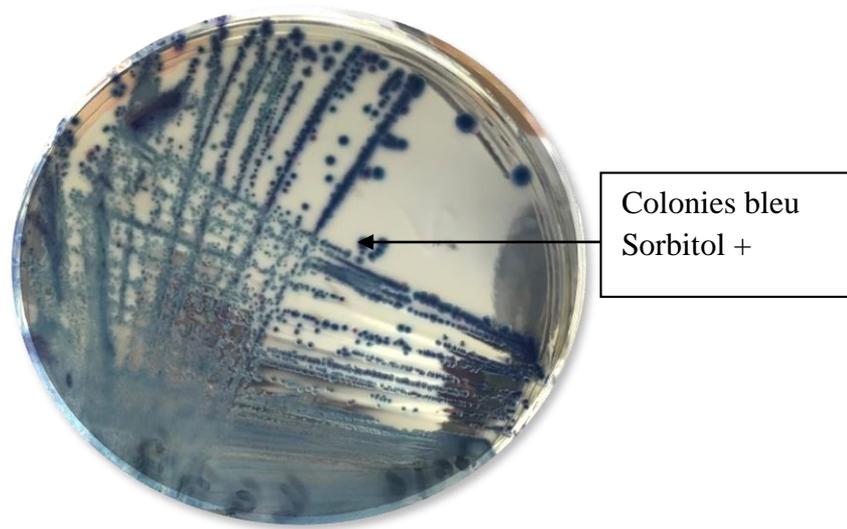
**Figure 15** : Colonies d'*E. coli* fermente le lactose sur milieu Hektoen.

La figure suivante montre des colonies d'*E. coli* donnent un aspect rose clair, lisse avec un contour régulier et ne fermentent pas le sorbitol (négatif) sur gélose Chromogène.



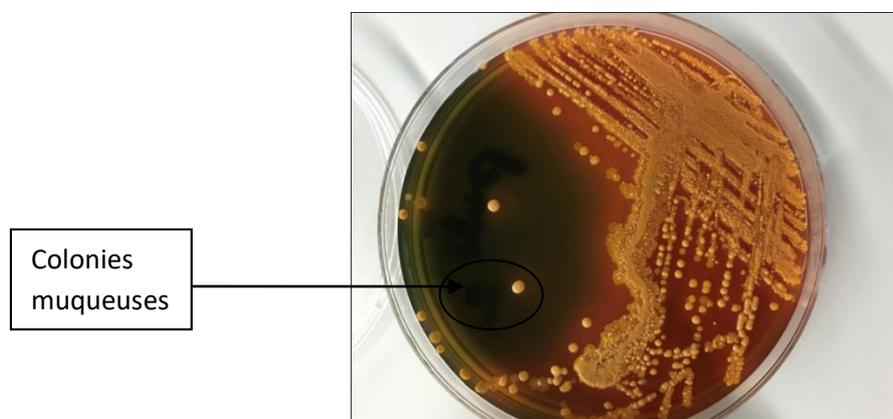
**Figure 16** : Aspect des colonies *E. coli* sorbitol négatif sur milieu Chromogène.

La figure ci-après montre des colonies d'*E. coli* bleu, fines, lisses avec un contour régulier et fermente le sorbitol (positif) sur gélose Chromogène .



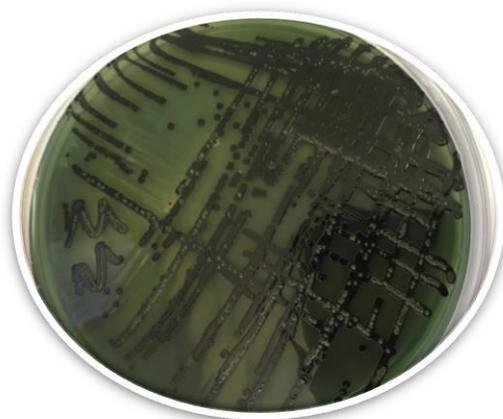
**Figure 17:** Aspect des colonies d'*E. coli* sorbitol positif sur milieu Chromogène.

La figure ci-dessous représente des colonies muqueuses de *Klebsiella* obtenus sur gélose Hektoen.



**Figure 18 :** Aspect des colonies de *Klebsiella* sur milieu Hektoen.

Nous avons obtenu des colonies noir, lisses et brillantes correspond à *Proteus* sur milieu Hektoen.



**Figure 19 :** Aspect des colonies de *Proteus* sur milieu Hektoen.

Nous avons obtenu à partir de notre prélèvement des viandes hachées des colonies transparentes avec un centre sombre correspond à *Pseudo Spp*.

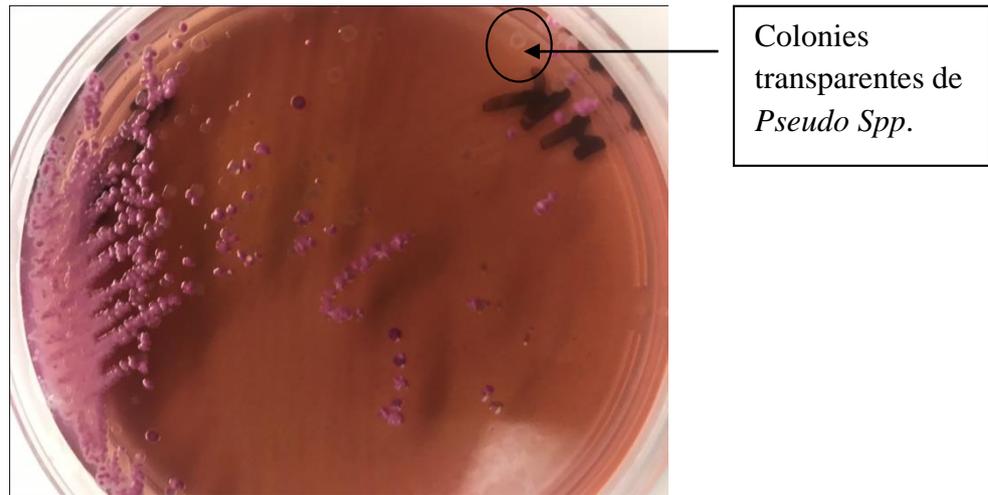


Figure 20 : Aspect des colonies de *Pseudo spp* sur milieu CT-SMAC.

## 2. Résultats d'identification biochimiques

### 2.1. Recherche de l'oxydase

L'absence de la coloration bleu foncé à violette révèle un résultat négatif et la coloration bleu foncé à violette révèle un résultat positif sur les disques d'oxydase



Figure 21 : Disque pour test oxydase

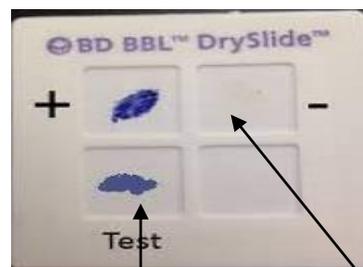
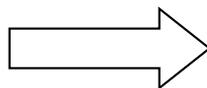


figure22 : Résultat +

Résultat –

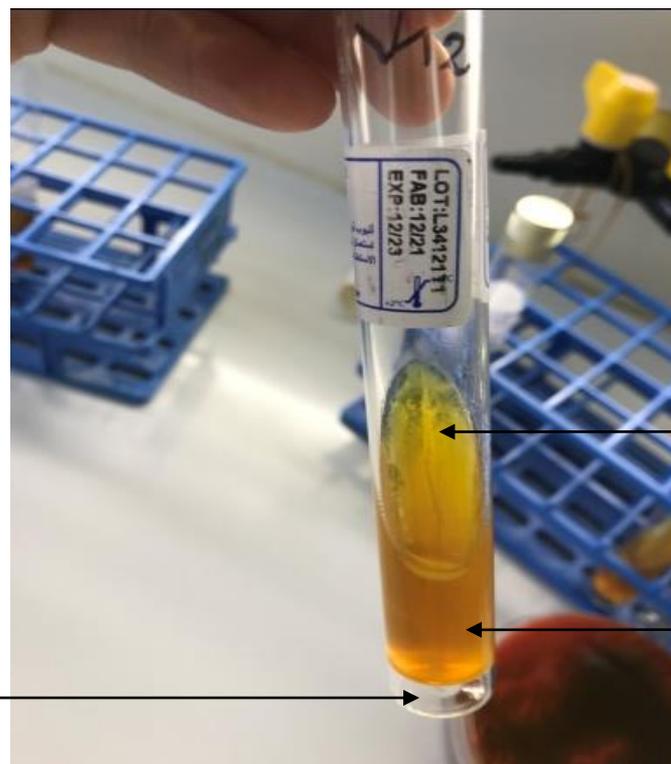
### 2.2. Test TSI

Après l'incubation du milieu TSI, nous avons obtenus les résultats suivants :

- Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du pH fera passer le milieu de la couleur originale au jaune. Après consommation du glucose, la bactérie poursuit la consommation du saccharose et/ou du lactose donnant une pente jaune et un culot jaune (acide sur acide (A/A)).
- Une couleur rouge foncé indique une alcalinisation des peptones.



Figure 23 : Aspect de TSI après l'incubation.

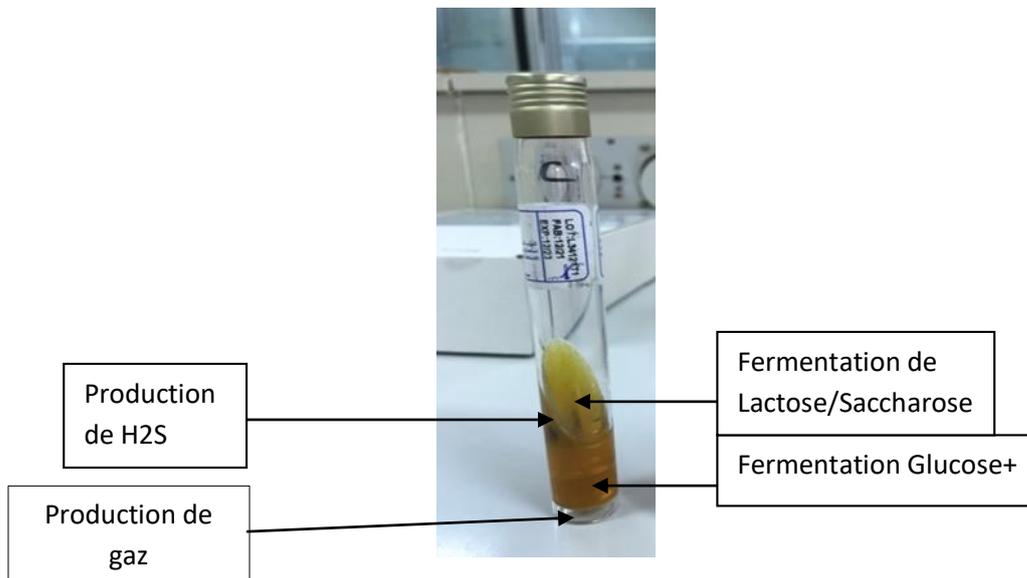


Fermentation du Lactose/Saccharose

Fermentation du Glucose

Production du Gaz

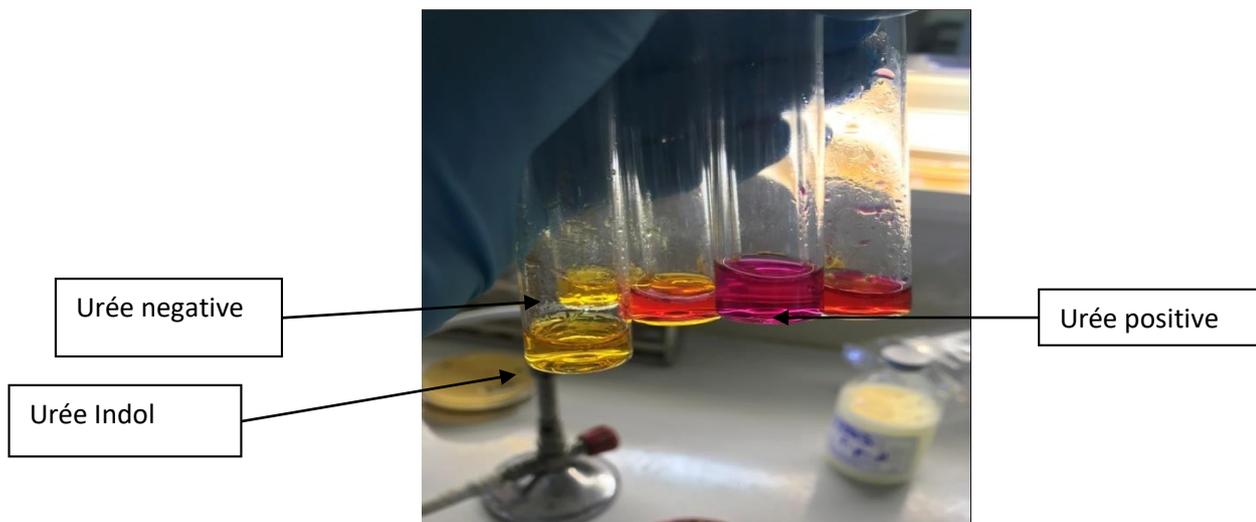
Figure 24 : Aspect des colonies fermentent les 3 sucres sur milieu TSI (Glucose+, Lactose+, Saccharose+, GAZ+)



**Figure 25 :** Aspect des colonies fermentent les 3 sucres et produisent de l'H<sub>2</sub>S sur milieu TSI (Glucose +, Lactose/Saccharose +, H<sub>2</sub>S+, GAZ+).

### 2.3. Production d'indole

La présence de l'indole est révélée après ajout du réctif de kovacs dans le milieu urée-indole. La formation d'un anneau rouge témoigne la production d'indole et un anneau jaune indique l'absence de la production d'indole



**Figure 26 :** Milieu urée- indole après l'incubation

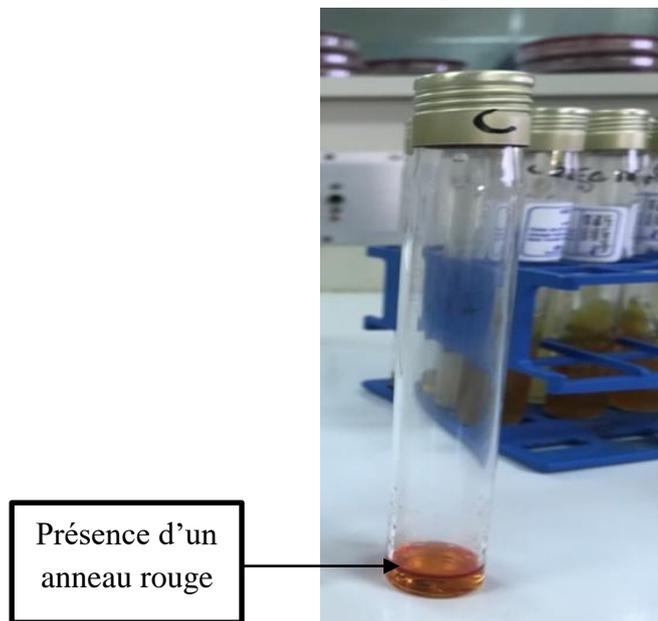


Figure 27 : Résultat d'urée négatif et la formation d'anneau rouge (indole positif).

#### 2.4. Galerie API 20 E

Nous avons obtenu après l'identification biochimique par Galerie API20 E les résultats suivants :

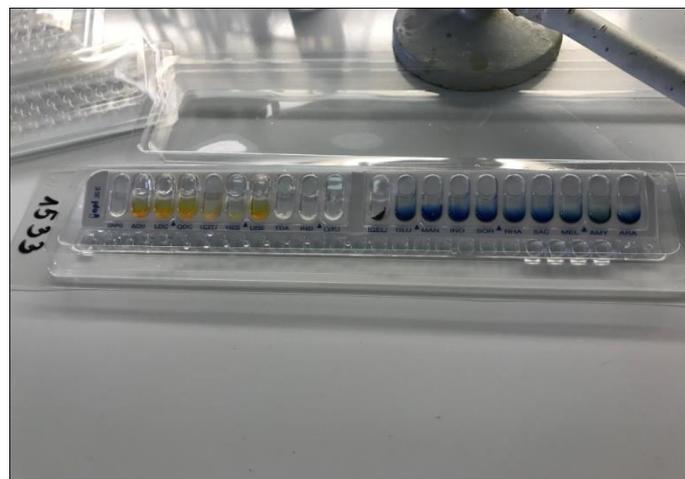


Figure 28 : Galerie API 20 E avant l'incubation.



Figure 29: *Citrobacter* Sur Galerie API20 E.

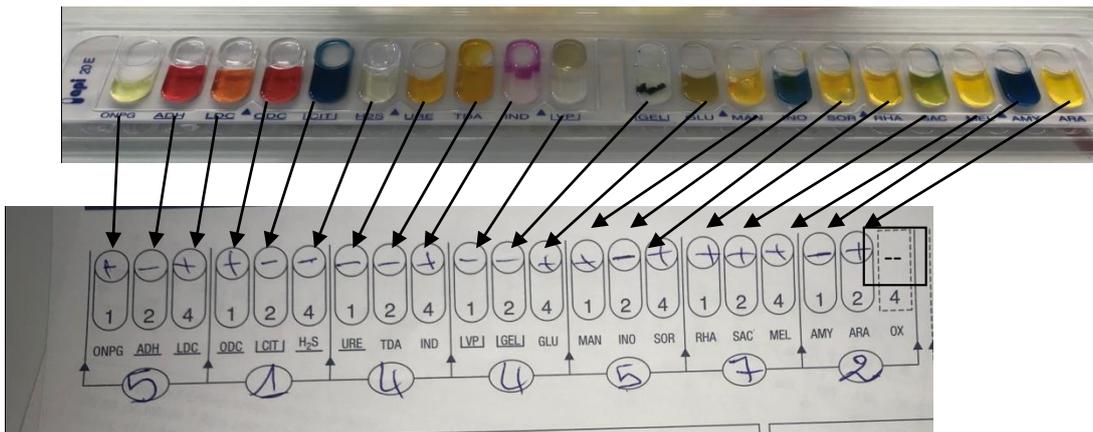


Figure 30 : Aspect d'*E. coli* sur Galerie API20 E.

### 3. Résultats immunologiques

La figure ci-dessous montre l'aspect des agglutinants sur le Latex anti O157 mettant en évidence l'absence de l'antigène somatique O157.

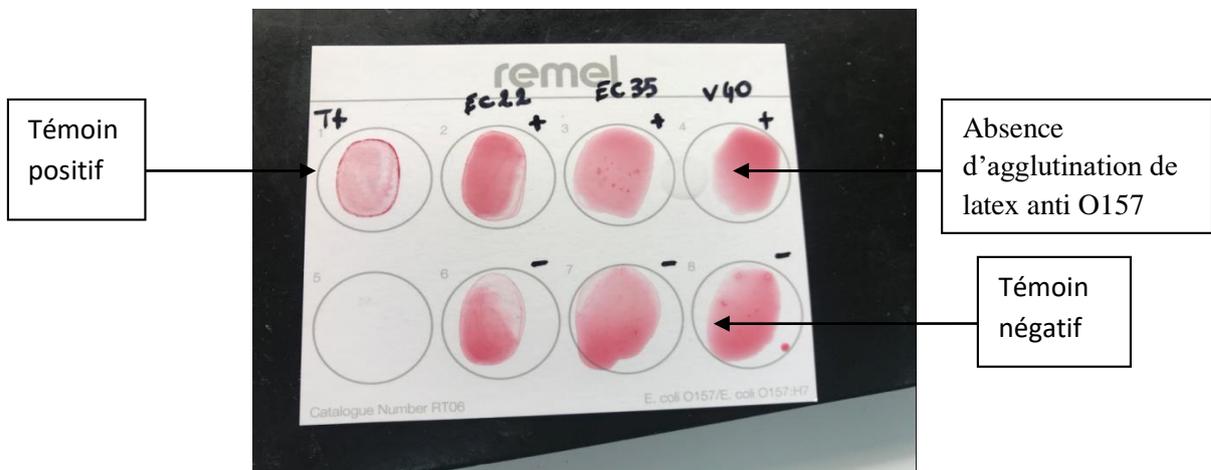


Figure 31 : Aspect de colonies non agglutinantes le latex anti-O157

## Discussion

Les protocoles de recherche d'*E. coli* O157:H7 sont plus au moins différents mais utilisent les mêmes réactifs. Pour l'isolement nous avons utilisé le protocole ISO 16654:2001, il permet avec une étape d'enrichissement, qu'on considère la plus importante, d'augmenter les chances d'isoler des *E. coli* O157:H7. En effet, l'ajout des antibiotiques agissant dans le milieu d'enrichissement permet, en ralentissant la croissance de la flore annexe, une meilleure croissance du pathogène, évitant ainsi l'apparition de « faux négatifs ».

Une fois cette étape effectuée, l'ensemencement sur SMAC qui est actuellement le milieu de référence pour l'isolement des STEC a permis de voir des colonies sorbitol négatives qui avec la  $\beta$ -glucuronidase sont les deux principaux caractères qui permettent d'identifier les *E. coli* O157:H7.

Les souches que nous avons isolées à partir des 109 prélèvements effectués répondent à ces principaux critères. L'identification biochimique en utilisant le système API 20E nous a montré qu'en est en présence des caractères différents.

L'absence de fermentation du sorbitol a, par exemple, justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC) qui a subi plusieurs modifications dans l'objectif d'augmenter le caractère sélectif vis-à-vis de O157:H7. Ainsi les méthodes biochimiques sont intéressantes et fondamentales pour la détection d'*E. coli* O157:H7 (Barka et Kihal, 2010). La plupart des études faites sur la viande bovine concerne en premier lieu la viande hachée, d'autres études concernent des prélèvements dans des abattoirs.

Notre étude a été effectuée sur 109 prélèvements parmi eux nous avons obtenus (tableau 07 ci-dessus).

Notre objectif à travers de cette étude a été également pour détecter l'*Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments. En effet, il a fallu beaucoup de temps pour réunir assez de prélèvements pour avoir un échantillonnage conséquent. Les résultats que nous avons obtenus ne concordent pas avec ceux obtenus jusqu'à ce jour en Algérie et dans le monde entier, car :

En 2007, Lila Ferhat, Amina Chahed, L. Ferhat, A. Chahed, S. Hamrouche ont détectés 11 échantillons contaminés par la bactérie pathogène *E. coli* O157:H7 réalisés sur 151 échantillons dans deux abattoirs d'Alger. Parmi les treize souches d'*E. coli* O157:H7 isolées, dix portent le gène *stx2* qui code pour la Shiga-toxine de type 2. Les souches produisant la toxine *Stx2* sont mille fois plus virulentes que celles qui produisent *Stx1* (Joly et Reynaud, 2003). Donc les souches isolées lors de cette étude sont potentiellement pathogènes et sont susceptibles de provoquer des épidémies. Une des

treize souches isolées possède uniquement les gènes *eae* et *ehxA*. Le même pathotype a été isolé par Zweifel à partir de selles de moutons. Dans cette même étude, ils ont pu isoler deux souches d'*E. coli* O157:H7 sorbitol et  $\beta$ -glucuronidase positives portant le gène *stx2*. Ces nouveaux caractères phénotypiques sont dus d'après Armstrong soit à une mutation, soit à une appartenance de ce variant phénotypique peu fréquent à un clone primitif qui existait depuis longtemps.

Entre 2001 et 2010, Mohammed Salih Barka a pris 756 échantillons de viande bovine surgelée importée de différents pays ont été testés dans le but de rechercher une éventuelle présence d'*E. coli* O157:H7. Ils ont détecté 5 souches *E. coli* O157:H7. Le taux des *E. coli* O157:H7 est variable d'un pays à un autre. Dans leur étude le gène *stx2* et le gène *eaeA* ont été détectés dans la plupart des souches analysées. Ceci est important car la présence de ces gènes est fortement associée aux maladies humaines. Ces caractérisations génétiques des souches isolées en recherchant les gènes de toxicité, était très importante d'une part pour confirmer qu'il s'agit bien d'*E. coli* O157:H7 et d'autre part pour confirmer le caractère pathogène de ces souches.

Au Canada, le 28 janvier 2022, il a été confirmé 14 cas d'infection à *Escherichia coli* dans les provinces d'Alberta (13) et Saskatchewan (1). Les individus sont tombés malades entre début décembre 2021 et début janvier 2022. Aucun décès, ni hospitalisation n'ont été signalés. Les personnes qui sont tombées malades ont entre 0 et 61 ans. La majorité des cas (64%) sont des femmes. Donc nous pouvons dire que peut être le pathogène *E. coli* O157 est en train de perdre leur pathogénicité.

À partir des résultats obtenus de cette recherche nous avons émis à quelques hypothèses dont lesquels :

- ✓ Les ovins et les bovins abattus au niveau des deux abattoirs ne sont pas porteurs d'*E. coli* O157:H7. Ceci est dû au fait que les bonnes pratiques d'hygiène d'abattage sont respectées dans les deux abattoirs. Il n'y a pas de contamination fécale des carcasses et par conséquent absence de ce pathogène sur leurs surfaces.
- ✓ Nos résultats peuvent indiquer la disparition de ce sérotype O157:H7, et peut être il est en train de laisser la place à d'autres espèces d'*E. coli* (O111, O26...).
- ✓ Peut-être la courte durée de la recherche et l'indisponibilité des amorces pour effectuer détection des STEC par PCR.

*Escherichia coli* O157 :H7 est une bactérie pathogène pour l'homme, portée par les ruminants (principalement les bovins) et représente un problème de santé publique sérieux en Amérique du Nord et en Europe. La plupart des cas d'affection sont due à la consommation d'aliments solides contaminés.

Le sérotype O157 :H7 reste à ce jour le plus étudié à travers le monde, car il a été la cause de milliers de d'infections et de dizaines de décès car il été isolé non seulement dans la viande bovine mais presque dans tous les types d'aliments consommés par l'homme.

Nos travaux ont permis de dire que les carcasses bovines et ovines, viande hachée, viandes en morceau, Margez et lait cru ne sont pas contaminé par *E. coli* O157. Les méthodes de détections phénotypiques, biochimiques et immunologiques ont montré l'absence des souches d'*E. coli* O157 :H7 sur tous les échantillons analysés. Nous avons constaté que le risque des toxi-infections alimentaires dues aux STEC, et plus précisément au sérotype O157 :H7, existe plus en ce moment en Algérie où la viande ovine et bovine est très prisée. Pour cela, une bonne connaissance de l'épidémiologie des STEC en Algérie et une bonne application des règles générales d'hygiène sur toute la chaîne, depuis l'élevage jusqu'à la distribution, doivent conduire à diminuer la pression de contamination.

Au vu des résultats obtenus, il est important de souligner l'importance de la recherche non seulement des *E. coli* O157 :H7 mais également des différents sérotypes de STEC pathogènes dans tous les aliments consommés car ils constituent un risque permanent pour la santé humaine. Du point de vue médical, la mise en place d'une recherche systématique de ces bactéries dans les selles sanglantes. Il est important de mettre en place une cellule pour la surveillance du syndrome hémolytique et urémique au niveau des CHU ce qui permettra d'appréhender l'incidence des infections à *E. coli* O157 :H7.

# Bibliographie

- AFSSA Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) Avril 2003** - 220 pages disponible sur le site Internet de l'AFSSA : <http://www.afssa.fr>
- Agus, A., S. Massier, A. Darfeuille-Michaud, E. Billard and N. Barnich (2014).** "Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies." *Biomed Res Int* 2014: 567929.
- Andral, B., Perelle, S., Decomble, C., Ducotterd, B., Lazizzera, C., Pichoire, M., et Et Fach, P. 2000.** Détection en abattoir du portage de *E. coli* O157:H7 par les bovins et de la contamination du matériel; caractérisation des souches pathogènes. In *Colloque de la Société Française de Microbiologie (Poster)* Paris, France.
- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I., and Orskov, F. 1988.** Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene*
- Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A. et Beach, M.J. 2004.** Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002.
- Bolduc, D., Srour, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S. et Lim, G. 2004.** Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Can. Commun. Dis. Rep.*
- Bouvet, J. et Vernozy-Rozand, C. 2000.** Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét.*
- Breuer, T., Benkel, D. H., Shapiro, R. L., Hall, W. N., Winnett, M. M., Linn, M. J., Neimann, J., Barrett, T. J., Dietrich, S., Downes, F. P., Toney, D. M., Pearson, J. L., Rolka, H., Slutsker, L., et Griffin, P. M. 2001.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.* 7:977-982.
- CAPRIOLI A., MORABITO S., BRUGERE H., OSWALD .2005,**E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*,2005,
- Caprioli., 1999.** Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. *Vet. Microbiol. carcasses in Algeria. J. Appl Microbiol.*,
- CDC. 2000.** Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh
- CHAHED. A., CHINA. B., MAINIL. J., DAUBE. G. 2006**Prevalence of enterohaemorrhagic
- Chalmers, R.M., Aird, H. et Bolton, F.J. 2000.** Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp Ser Soc*

Appl Microbiol

- Chalmers, R.M., Salmon, R.L., Evans, J., Chart, H., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P. et Sillis, M. (1999)** Vero cytotoxinproducing *Escherichia coli* (VTEC) risk factors in the farming environment. Abstracts of the second international symposium of the European study group on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Acta Clin Belg cheese curds-Wisconsin, June 1998. MMWR Morb Mortal Wkly
- Coia J, 1998.** chemical ,microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infections, FEMS.
- Coia, J.E. (1998)** Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunol Med Microbiol AFSSA
- Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T. et Stuart, J. (1999)** Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. Eur J Clin Microbiol Infect Dis
- Craun, G.F., Calderon, R.L. et Craun, M.F. 2005.** Outbreaks associated with recreational water in the United States. Int J Environ Health Res
- Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D.M., Hunter, S.B., Hoekstra, R.M., Wong, S.K., Griffin, P.M. et Van Gilder, T.J. 2002.** An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. N Engl J Med entérotoxigène (ETEC) et entérohémorragique (EHEC), Relevé Epidémiologique Hebdomadaire, *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine
- Escherichia coli O157 :H7 Christine Vernozy-Rozand Marie-pierre .2005.** Montet 2eme édition
- Espié, E., et Vaillant, V. 2003.** Toxi-infection collective Alimentaire à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, gironde Juin 2002-rapport d'investigation. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France
- Evans, J., Chalmers, R.M., Chart, H., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P., Sillis, M. et Thomas, D.R. (2000)** Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. Eur J Epidemiol
- Fairbrother, J. M., & Nadeau, E. (2006).** *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals.
- Fauchère J.L., et Avril, J.L. 2002.** Bactériologie générale et médicale.. Ellipses edition Marketing.
- Fauchère, J.L., et Avril, J.L. 2002.** Bactériologie générale et médicale..Ellipses edition Marketing
- Feng p, 1995,** *Escherichia coli* sérotype O157 :H7 novel vehicles of infection and emergence of
- Friedman, M.S., Roels, T., Koehler, J.E., Feldman, L., Bibb, W.F. et Blake, P. 1999.** *Escherichia*

- coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. Clin Infect Dis
- Hofmann, S. L. (1993)** Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Am J Med Sci. How to cite this resource - Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). ( The prevention of *Escherichia coli* O157 :H7 A shared responsibility Food Safety Authority of Ireland, Dublin, 1999, 50 pages)
- J. M., et Blake, P.A. 1988.** *E. coli* O157:H7, an emerging intestinal pathogen. *J. Am. Med. Assoc.* 24:3567-3570.
- J. M., et Blake, P.A. 1988.** *E. coli* O157:H7, an emerging intestinal pathogen. *J. Am. Med. Assoc.*
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K. et Khakhria, R. 1998.** *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect*
- Johnson, J. R. and T. A. Russo 2002.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : “The other bad *E coli* ”. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139(3): 155-162.
- Kaper , J.B, Nataro JP et Mobely , H.L .2004.** Pathogenic *Escherichia coli* . *Nat Rev. Microbiol*
- KARCH H. et MEYER T. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-**
- Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. et Heesemann, J. 1995.** Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases.
- Kovacs, M. J., Roddy J., Gregoire S., Cameron W., Eidus L., and Drouin J.. (1990)** Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med.*
- Law D 2000.** Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli* . *Journal of applied microbiology.*
- Le Minor, L., Popoff, M.Y., et Bockemuhl, J. 1990.** Supplement 1989 to the Kauffmann- White scheme. *Res. Microbiol.*
- Le Minor, L., Popoff, M.Y., et Bockemuhl, J. 1990.** Supplement 1989 to the Kauffmann- White scheme. *Res. Microbiol.*
- Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J. et Roy, S.L. (2006)** Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ.*
- Livre bactériologie alimentaire compendium d’hygiène des aliments 2<sup>eme</sup> édition MICHEL FEDERIGHI P71 ANNEE 2005)**
- Loukiadis , Lyon, 2002** E. Importance du danger lié à l’existence d’*Escherichia coli*

vérocytotoxiques dans l'environnement. Th. Med.

- Ludwig, K., Petric, M., Blanchette, V., et Karmali, M. 1998.** Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shigatoxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin. Infect. Dis.*
- MacDonald, K.L., O'Leary, M.J., Cohen, M.L., Norris, P., Wells, J. G., Noll, E., Kobayashi, Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Grealley, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J., et Mc Keown, P. 2005.** Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005.
- Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Grealley, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J. et Mc Keown, P. 2005.** Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro Surveill*
- Matthews, K.R., Murdough, P.A., et Bramley, A.J. 1997.** Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.*
- Mead PS, Griffin PM. Escherichia coli O157:H7. Lancet. 1998** Oct 10;352(9135):1207-
- Miller, L. G., and Kaspar C. W. 1994.** *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot*
- Morgan, G. M., Newman C., Palmer S. R., Allen J. B., Shepherd W., Rampling A. M., Warren R. E., Gross R. J., Scotland S. M. and Smith H. R. 1988.** First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O 157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect*
- NEPAD., 2006** Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Appui au développement de la filière ovine avec installation d'un abattoir aux normes internationales dans la wilaya de Djelfa.
- O'Brien, S.J., Adak, G.K. et Gilham, C. 2001.** Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis*
- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M. et Pennington, T.H.(2002)** Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol*
- OMS, Escherichia coli entérohémorragique (EHEC), 2005**
- OMS.** Nouveaux développements dans la mise au point de vaccins contre les infections à *E. coli*
- Padhye. N.V et Doyl. E M.P. 1992.** *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology, pathogenesis and*

methods for detection in foods. *J. Food. Protect.*

**Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A. et Paton, J.C. 1996.** Molecular microbiological investigation of an outbreak of haemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*

**Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A. et Paton, A.W., Voss, E., Manning, P.A., and Paton, J.C. 1997.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Infect Immun*

**Paton, J.C. (1996)** Molecular microbiological investigation of an outbreak of haemolytic uremic

**Paunio, M., Pebody, R., Keskimaki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E., et Leinikki, P. 1999.** Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.*

**Paunio, M., Pebody, R., Keskimaki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E. et Leinikki, P. 1999.** Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* phenotypic variants , emerging infectious diseases

**Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., et Forestier, C. 2000.** Prevalence and characterization of Shiga toxin- producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.*

**READ. S.C., CLARKE. R.C., MARTIN. A., DE GRANDIS. S.A., HII J., MCEWENS S. et GYLES C.L. :** Polymerase chain reaction for detection of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources, 1992.

**Richard Sezonov, Guennadi .2008.** Biologie et génétique d'*Escherichia coli* Richard Sezonov, page11

**Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E.S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., et Cohen, M. L. 1983.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*

**Roberts, C.L., Mshar, P.A., Cartter, M.L., Hadler, J.L., Sosin, D.M., Hayes, P.S. et Barrett, T.J. 1995.** The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol and Infect*

**Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995)** Molecular analysis of the plasmid-encoded

**Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. 1995.** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun.*

- Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R., and Goni, F.M. 1999.** Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol*
- Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M. et Ogden, I.D. (2006)** *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol*
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. et O'Brien, A.D. 1988.** Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* 170
- Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., Yamauchi, A., Nakayama, O., Sakai, H., Yamamoto, K., Nagasaka, Y., Nakano, T., Ihara, T. et Kamiya, H. 2005.** An outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture
- Sutra L, Federighi M, Jouve J.L, manuel de bacteriologie alimentaire ,polytechnica ,paris ,**  
**SUTRA. L, FEDERIGHI. M et JEUVE. J.L. Manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica, Paris, 1998, 308p.**  
 syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*  
**toxin producing Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., 1989,**
- Vernozy-Rozand et Montet M-P , paris 2001** *Escherichia coli* O157 :H7 , Tec et Doc ,
- Vernozy-Rozand et Montet M-P 2001.** *Escherichia coli* O157 :H7 , Tec et Doc , paris 2001 ;135 p.
- Vernozy-Rozand et Montet, 2001.** Livre *Escherichia coli* O157 :H7 1<sup>er</sup> édition
- Wales, A.D., Pearson, G.R., Skuse, A.M., Roe, J.M., Hayes, C.M., Cookson, A.L. et Woodward, M.J. 2001.** Attaching and Effacing Lesions Caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Inoculated Neonatal Lambs. *J. Med. Microbiol.*
- Zadik. P.M., Chapman. P.M et Siddons. P.A. 1993.** Use of tellurite for the selection of verocytotoxic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*

## ANNEXE 1

### Matériels utilisés

#### 1-Matériel de prélèvement :

Afin de procéder aux différents prélèvements, le matériel et accessoires suivants ont été utilisés :

- Ecouillons stériles
- Gants
- Glacière

#### 2-Equipement de laboratoire

- Bec Bunsen
- Etuve bactérienne réglée à différentes températures : 55, 37et 42°C
- Bain-marie réglé à 44°C
- Stomacher
- Mélangeur de type vortex
- Sac stérile
- Pro pipette
- Flacon stérile de 500ml
- Plaque chauffante agitatrice
- Barreau mètre
- Thermomètre
- Balance électrique
- Pipette de 5ml
- Eprouvette
- Bec benzène
- Pipette pasteur
- Boite pétri
- Pince
- Galerie API 20 E
- Dry disque (oxydase)
- Densimètre

- Latex Wellcolex E. COLI O157

**Produits et milieu utilisées**

- Eau physiologique
- Eau distillé
- Milieu TSI
- Milieu chromogène
- Milieu CT-SMAC
- Milieu Hektoen stérile
- Milieu TSB
- BHIB
- Urée
- Indole
- GN incliné

➤ **Réactifs utilisés**

- Novobiocine
- Céfixime tellurite
- Réactif kovacs
- Réactif VP1
- Réactif VP2
- Réactif TDA
- Huile de vaseline
- O157 test latex

## Matériels utilisés



**Figure 01 :** Balance électrique



**Figure 02 :** Étuve d'incubation à 55°C



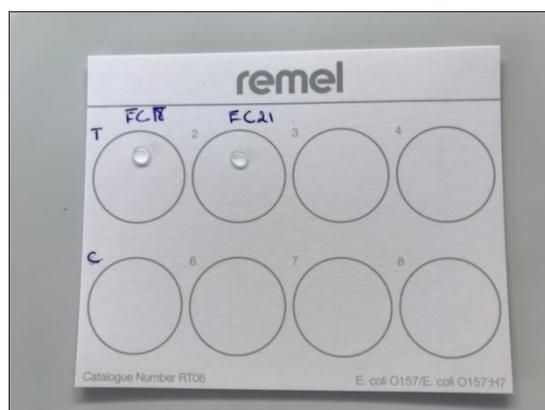
**Figure 03:** Étuve d'incubation à 44°C



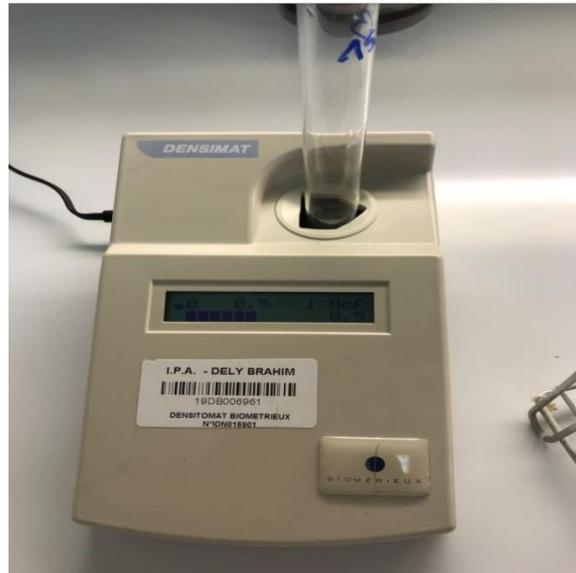
**Figure 04 :** Etuve d'incubation à 37°C



**Figure 05:** Stomacher 400 circulator



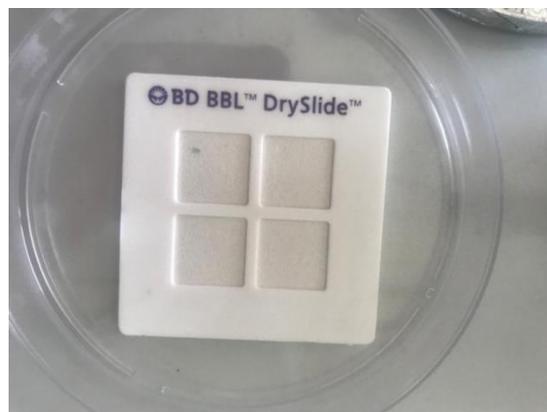
**Figure 06:** Latex test E .Coli O157



**Figure 07 :** Densimètre



**Figure 08:** Éprouvette de 250 ml



**Figure 09 :** Dry disque (test d'oxydase)

## Produits utilisés

**Figure 10:** Cefixime tellurite**Figure 11 :** TSB, Novobiocine , eau distillé stérile**Figure 12:** Réactif : TDA , VP1, VP2, Kovacs



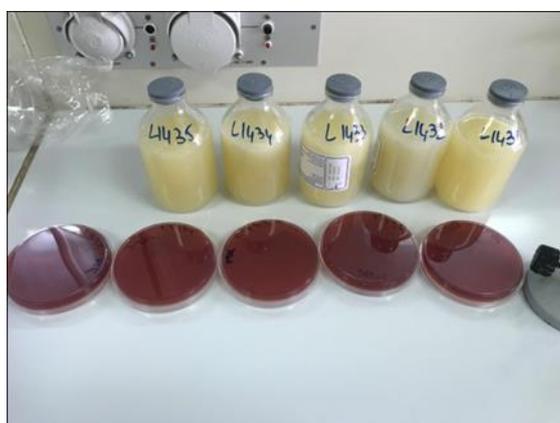
**Figure 13:** *E. coli* O157 control +, anti *E. coli* O157, control -.



**Figure 14:** Milieu de culture SMAC

Annexe

**Figure 15** : Aspect de lait cru dans TSB+N avant l'enrichissement.



**Figure 16** : Aspect de lait cru après l'incubation.



**Figure 17** : Aspect de viande hachée après l'incubation.



**Figure 18 :** Aspect des écouvillons prélevés à partir des carcasses bovines et ovines dans un milieu de transport BHIB après l'incubation.



**Figure 19 :** Aspect des écouvillons dans un milieu de transport et d'enrichissement TSB+N après l'incubation

## Annexe 2 : résultats générales des prélèvements analysés

N de prélèvement	Date de prélèvement	Lieu de prélèvement	Nature de viande	Résultats
V1	29/03/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V2	29/03/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V 3	29/03/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V4	29/03/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V5	10/04/2022	MILIANA	Viande congelé	<i>E.coli</i>
V6	10/04/2022	AIN Naaja	Viande morceau	<i>E.coli</i>
V7	10/04/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>E.coli</i>
V8	10/04/2022	MILIANA	Viande morceau	<i>E .coli</i>
V9	17/04/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V10	17/04/2022	MILIANA	Viande hachée	<i>Entérobactérie</i>
V11	17/04/2022	MILIANA	Margez	<i>Entérobactérie</i>
V12	17/04/2022	MILIANA	Margez	<i>Entérobactérie</i>
V13	24/04/2022	EL HARRACHE	Viande hachée	<i>Pseudomonas spp</i>
V14	24/04/2022	CHEVALLEY	Viande hachée	<i>E .coli</i>
V15	24/04/2022	CINQ MISON	Viande hachée	<i>E.coli</i>
V16	24/04/2022	DELY BRAHIM	Viande hachée	<i>Cyrobacter spp</i>
V17	24/04/2022	CINQ MISON	Margez	<i>Pseudomonas spp</i>
V18	24/04/2022	DELY BRAHIM	Margez	<i>Pseudomonas spp</i>
V19	08/04/2022	BAB EL OUED	Viande préparé	<i>Cyrobacter spp</i>
V20	08/05/2022	CHERAGA	Viande hachée	<i>E.coli</i>

V21	08/05/2022	CHERAGA	Mergez	<i>E .coli</i>
V22	15/05/2022	BACHJERAH	Viande hachée	<i>Pseudo</i>
V23	15/05/2022	BACHJERAH	Margez	<i>Pseudo</i>
V24	15/05/2022	DRARIA	Viande hachée	<i>Klebsiella</i>
V25	15/05/2022	DRARIA	Margez	<i>Pseudomonas spp</i>
E21	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E .coli</i>
V26	15/05/2022	EL HARRACH	Viande morceau	<i>Klebsiella</i>
E22	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
<del>V27</del>	<del>15/05/2022</del>	<del>DELY BRAHIM</del>	<del>Margez</del>	<del><i>Pseudomonas spp</i></del>
E23	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E24	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E25	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E26	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E27	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E28	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E29	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E30	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E31	17/04/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E32	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E33	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E34	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E35	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E36	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E37	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E38	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E39	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E40	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E41	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E42	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>

E43	24/04/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E44	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E45	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Proteus spp</i>
E46	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E47	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Klebsiella</i>
E48	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E49	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>E .coli</i>
E50	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Citrobacter spp</i>
E51	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E52	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E53	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E54	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E55	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E56	08/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E57	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E58	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E59	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E60	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Klepsiella</i>
E61	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Pseudomonas spp</i>
E62	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E63	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E64	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E65	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E66	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E67	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Cytrobacter spp</i>
E68	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>

E69	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E70	15/05/2022	ELHARACH	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>

N de prélèvement	Date de prélèvement	Lieu d'abattoir	Nature de Prélèvement	Résultats
E01	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E02	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E03	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E04	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E05	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E06	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E07	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E08	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E09	29/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E10	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E11	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E12	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E13	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E14	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E .coli</i>
E15	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>
E16	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>

E17	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E18	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E19	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>E.coli</i>
E20	10/03/2022	MILIANA	Ecouvillons	<i>Entérobactérie</i>

N de prélèvement	Date	Fermes	Nature de lait	Résultats
L1	29/03/2022	A1	Lait de vache cru	<i>E.coli</i>
L2	29/03/2022	A1	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L3	29/03/2022	A1	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L4	29/03/2022	A1	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L5	29/03/2022	A1	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L6	03/04/2022	T1	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L7	03/04/2022	T1	Lait de chèvre cru	<i>Entérobactérie</i>
L8	03/04/2022	T2	Lait de vache cru	<i>Cyrobacter spp</i>
L9	17/04/2022	A2	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L10	17/04/2022	A2	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L11	17/04/2022	A2	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>
L12	17/04/2022	A2	Lait de vache cru	<i>Entérobactérie</i>

## Annexe 03

### 1-Premier milieu d'isolement sélectif : gélose MacConkey au sorbitol cefixime tellurite

#### 1-2Milieu de base

##### Composition :

Digestat enzymatique de caséine	17,0g
Digestif enzymatique de viande	3,0g
Sorbitol	10,0g
Sels biliaires N°3	1,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Rouge neutre	0,03g
Violet de méthyle	0,001g
Agar	9g à 18g <sup>a</sup>
Eau	1000ml

##### Préparation

Dissoudre les composants de base ou la base déshydratée complète dans l'eau en chauffant jusqu'à ébullition. Ajuster le pH, Si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de  $7,1 \pm 0,2^\circ$ .

Stériliser à l'autoclave à  $121^\circ$  Pendant 15 min.

#### 1-3 Solution de tellurite de potassium

##### Composition

Tellurite de potassium à usage bactériologique	0,25g
Eau	100ml

##### Préparation

Dissoudre le tellurite de potassium dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane.

Cette solution peut être stockée à température ambiante pendant un mois au maximum, mais ne doit pas être utilisée en cas de formation de précipités blancs.

### 1-4 Solution de cefixime

#### Composition

Cefixime	5,0mg
Eau	100,0ml

#### Préparation

Dissoudre la cefixime dans l'eau et stériliser par sur membrane.

Cette solution peut être stockée à  $3^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant une semaine.

### 1-5 Milieu complet

#### Composition

Milieu de base	1000ml
Solution de tellurite de potassum	1,0ml
Solution de cefixime	1,0ml

#### Préparation

Refroidir le milieu de base nouvellement stérilisé entre  $44^{\circ}\text{C}$  et  $47^{\circ}\text{C}$ , ou faire fondre par chauffage à la vapeur le milieu de base préalablement stérilisé et solidifié, puis le refroidir entre  $44^{\circ}\text{C}$  et  $47^{\circ}\text{C}$ .

Ajouter 1ml de solution de tellurite et 1ml de solution de cefixime à 1000ml de milieu de base.

Mélange et verser par quantités d'environ 15ml dans des boîtes de pétri stériles. Laisser solidifier.

La concentration finale est de 2,5 mg /l pour le cefixime.

## 2-Deuxième Milieu Chromogène Sélectif pour la détection simultanée d'E. Coli et de coliformes dans l'eau et les échantillons d'aliments

### Composition

Peptone Bactériologie	3,0
Chlorure de sodium	5,0
Tampon phosphate	4,9
Pyruvate sodique	1,0
Tryptophane	1,0
Sorbitol	1,0
Mélange chromogénique	0,36
Tergitol 7	0,1
Agar Bactériologique	10,0

### Préparation :

Mettre en suspension 13,6 gramme du milieu dans un 500 litre d'eau distillée, Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente. Faire bouillir pendant 2 heures jusqu'à dissolution complète. Evitez la surchauffe. Ne pas autoclaver. Laisser refroidir à 45-50°C et distribuer dans des boites pétries. Le milieu préparé doit être conservé à 8-15°C. La couleur du milieu préparé est limpide et clair.

### 3- Milieu d'enrichissement : Bouillon trypyone de soja modifié à la novobiocine (mTSB+N)

#### Composition

Digestat enzymatique de caséine	17 ,0g
Digestat enzymatique de soja	3,0g
D(+) glucose	2,5g
Sels biliars N° 3	1,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Di-Potassium hydrogénophosphate(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4 ,0g
Eau	1000ml

#### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant, Si nécessaire. Ajuster le Ph à l'aide du PH-mètre , si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,4± 0,2 à 25°C.

Répartir les milieux par quantités appropriées dans des flacons ou des bouteilles.

Stériliser à l'autoclave réglé à 121°C pendant 15 min.

#### 3-1 Solution de novobiocine

##### Composition

Novobiocine	0,45g
Eau	100ml

##### Préparation

Dissoudre la novobiocine dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane.

Préparer le jour de l'utilisation.

#### 3-2 préparations du milieu complet

Juste avant utilisation, ajouter 1ml ou 4ml de solution de novobiocine à 225ml ou 990ml de milieu mTSB refroidi.

La concentration finale de novobiocine est de 20mg par litre de mTSB.