

Génotype de virulence et phénotype de résistance des bactéries isolées sur des carcasses de bovins pasteurisées à la vapeur

H. Corantin, Département des Sciences et Technologie des aliments / FAMV / UEH

RÉSUMÉ

Corantin, H. 2005. Génotype de virulence et phénotype de résistance des bactéries isolées sur des carcasses de bovins pasteurisées à la vapeur. RED. 2 (1): 18—24

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de la vapeur sur des bactéries potentiellement pathogènes isolées sur des carcasses de bovins en les caractérisant pour différents facteurs de virulence et de déterminer la susceptibilité de ces dernières vis-à-vis des agents antimicrobiens usuels. L'identification des bactéries a été faite sur les caractères culturels et biochimiques. Les isolats d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* ont été testés pour différents facteurs associés à leur virulence, respectivement, par technique d'hybridation sur colonie et par PCR. La susceptibilité et la résistance aux antibiotiques des isolats ayant des facteurs de virulence ont été testées par antibiogramme par la méthode de diffusion en gélose. La prévalence des *E. coli* dotés de un ou plusieurs gènes de virulence a été de 14,68% soit 11,88% des isolats obtenus avant pasteurisation, 22,21% des isolats obtenus après pasteurisation et 31,25% des isolats obtenus après réfrigération. Tous les isolats de *L. monocytogenes* se sont avérés positifs pour les trois principaux facteurs de virulence qui ont été testés (*hlyA*, *inlB* et *pclB*). Les antibiogrammes montrent que certains isolats sont sensibles à tous les antibiotiques, certains montrent une sensibilité intermédiaire et d'autres sont multirésistants. Ces résultats confirment donc que les aliments d'origine animale tels la viande de bovins peuvent constituer une source potentielle de transmission pour l'homme de certaines bactéries pathogènes résistantes aux agents antimicrobiens.

INTRODUCTION

L'émergence de certains pathogènes alimentaires, tels *Salmonella Typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, et les *E. coli* vérotoxigènes, représente une grave menace pour la santé publique (1), non seulement par les infections qu'ils initient mais surtout par leur capacité à transférer leur résistance aux autres pathogènes alimentaires. La présence de ces pathogènes sur les carcasses est souvent le résultat d'une contamination du muscle pendant les processus d'habillage et d'éviscération (2-4). Soucieux de minimiser les risques liés à la présence de pathogènes alimentaires sur les carcasses, les organismes gouvernementaux tels FSIS\USDA ont imposé à l'industrie des viandes des mesures de gestion des dangers microbiologiques afin de contrôler les points critiques de l'abattage (5). De ce fait, plusieurs technologies ont été développées pour améliorer la sécurité microbiologique des carcasses à l'abattoir (6-8). La pasteurisation à la vapeur représente l'une des technologies les plus prometteuses permettant de contrôler la contamination microbienne des carcasses à l'abattoir (9-12). Bien que son efficacité dans la réduction de la charge microbienne totale y compris celle des pathogènes ait été démontrée, au-

cune étude n'a, jusqu'à présent, été conduite pour évaluer l'effet de la vapeur sur la sélection des microorganismes en rapport avec leur virulence et leur sensibilité aux antimicrobiens.

L'objectif de cette étude était de vérifier l'effet de la pasteurisation à la vapeur sur la sélection de certains pathogènes alimentaires émergeant en étudiant chez eux différents facteurs de virulence et aussi en vérifiant leurs pathotypes de résistance vis-à-vis des agents antimicrobiens usuels.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Situation de l'étude

Cette étude a été réalisée sur des carcasses de vaches laitières de réforme dans un abattoir sous inspection fédérale situé au Québec.

Échantillonnage

3009 échantillons ont été prélevés sur 1003 carcasses afin de réaliser les analyses microbiologiques. Les prélèvements bactériens ont été effectués par chiffonnage sur des sites de 10X10 cm choisis aléatoirement selon une grille de 126 sites établie par Gill et Jones (1999) (13). Les prélèvements obtenus à l'aide de gaze stérile de 5X5 cm ont été placés dans 25 ml d'eau peptonnée tampon-

née à 0.1 % (p/v) (Oxoid Inc, Nepean, Ontario) (solution mère). Les échantillonnages ont été réalisés en trois temps soit immédiatement avant pasteurisation (A), immédiatement après pasteurisation (B) et après 24 heures de réfrigération (C). Les prélèvements (A) et (B) ont été effectués au même site d'échantillonnage sur chacune des 2 demi-carcasses. Le prélèvement (C) a été effectué sur un site contigu au site B. Les échantillons ont été gardés à 4°C pendant le transport et les analyses ont été réalisées le même jour.

Analyses microbiologiques

Les échantillons ont été traités pour rechercher les *E. coli* génériques et évaluer l'incidence de *L. monocytogenes* et de *Salmonella* spp.

Les *E. coli* ont été isolés par technique d'inoculation sur pétrifilm (3M Canada, Inc., London, Ontario). Brièvement, les pétrifilms ont étéensemencés en utilisant 1 mL de la suspension mère, en suivant les indications prescrites par le fabricant. Les pétrifilms ont été ensuite incubés en aérobiose à 35°C pendant 48 heures. Les colonies obtenues ont été dénombrées manuellement à l'aide d'une loupe à grossissement. Les colonies bleuies avec du gaz sont comptées pour des *E. coli*. L'identification des *E. coli* isolés à partir des pétrifilms a été faite sur les caractères culturels, biochimiques (API 20E) (Biomérieux Canada Ltd, St-Laurent, Montréal).

La recherche qualitative de *L. monocytogenes* a été effectuée par la méthode suivante. Brièvement, 5 mL de la suspension mère ont été transférés dans 45 mL de LEB (*Listeria* Enrichment Broth) (Les Laboratoires Quelab, Montréal, Québec) puis incubés en aérobiose à 30°C pendant 48 heures. Ensuite, 0,10 mL du bouillon LEB a été transféré dans 10 mL de bouillon Fraser modifié

(Oxoid Inc, Nepean, Ontario) et incubé à 35°C pendant 24 à 48 heures en aérobiose. Après 24 heures d'incubation, les bouillons ont été vortexés puis réincubés 2 à 6 heures pour être ensuite interprétés : les cultures positives ont été inoculées sur gélose Oxford modifiée (Oxoid Inc). Les bouillons négatifs ont été réincubés 24 heures additionnelles, et les cultures positives, inoculées sur gélose Oxford modifiée. Ces dernières furent incubées 24 à 48 heures à 35°C. Les colonies suspectes ont été ensemencées sur des géloses TSA-YE sang de cheval (Trypticase-soya agar additionnée d'extrait de levure) (Les Laboratoires Quélab, Montréal, Canada), puis incubées à 35°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies démontrant de l'hémolyse β furent soumises au test de mobilité, à l'utilisation des sucres (xylose, rhamnose et mannitol), la coloration de Gram, la recherche de la catalase et l'épreuve de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson). L'identification finale a été réalisée à l'aide d'un API *Listeria* (Biomérieux Canada Ltd, St-Laurent, Montréal) suivant les directives du fabricant.

La recherche qualitative de *Salmonella* spp. a été réalisée par la méthode suivante : Les gazes ont été transférées dans 25 mL de bouillon nutritif (Oxoid Inc), puis incubées à 35°C pendant 24 heures en aérobiose. Ensuite, un enrichissement en milieu sélectif a été effectué en transférant 1 mL du bouillon dans 9 mL de TBG (Tetrathionate Brilliant Green) (Difco, Détroit, MI, USA) qui a été incubé à 42°C pendant 24 heures en aérobiose. L'isolement a été obtenu sur des géloses BGS novobiocine (Brillant Green Sulfa agar) (Laboratoire Quelab, Montréal, Québec) incubées à 35°C pendant 24 à 48 heures. Les tests biochimiques TSI (Triple Sugar Iron) et urée ont été effectués sur les colonies typiques. Les isolats ont été confirmés par une épreuve d'agglutination avec un antisérum somatique polyvalent (Salmonella O Antiserum Poly A-1 & Vi) (Difco, Détroit, MI, USA) et envoyés pour sérotypage au Laboratoire de Santé Canada

(Guelph, Ontario, Canada).

Détection des gènes de virulence chez les isolats d'*E. coli*

La détection des gènes de virulence chez les isolats d'*E. coli* a été effectuée par technique d'hybridation sur colonies suivant des méthodes précédemment décrites par Caya et coll. (1999) (14). Brièvement, les fragments d'ADN ont été marqués par la [α - 32 P]dCTP en utilisant une trousse d'amorces polyvalentes (Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Suède) conformément aux directives du fabricant. Pour l'hybridation sur colonie, les isolats ont été ensemencés sur gélose Luria-Bertani (Difco) et incubés à 35°C pendant 4 à 5 heures. Les colonies ont été ensuite transférées sur papier filtre Whatman 3MM (Whatman International Ltd, Springfield, UK). Les filtres ont été traités, hybridés et révélés par autoradiographie. Des sondes génétiques ont été utilisées pour détecter les facteurs de virulence suivants : Intmine (*eae*), P-fimbriae (*pap*), SFA (S-fimbriae adhesins), aérobactine, hémolysine (*hly*), CNF (cytotoxique necrosing factor), vérotoxines (VT1 et VT2), toxines thermostables (Sta et Stb) et toxines thermolabiles (LT).

Détection des gènes de virulence chez *Listeria monocytogenes*

Extraction de l'ADN. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide de la trousse DNeasy (Qiagen Inc, Ontario) suivant les indications du fabricant. Brièvement, à partir d'une culture pure fraîche sur gélose au sang, une suspension bactérienne a été préparée dans 1 mL d'eau stérile puis centrifugée à 13000 rpm pendant 2 min 30 sec. Ensuite le culot a été resuspendu dans 180 μ L de tampon ATL. De la protéinase K (20 μ L) a été ajoutée au mélange qui a été vortexé et incubé à 55°C pendant 3 heures. Après digestion, 200 μ L de tampon AL a été ajouté au lysat, puis vortexé et incubé à 70°C pendant 10 min. Ensuite, 200 μ L d'alcool éthylique (96%) a été ajouté au culot puis vortexé. Le tout a été déposé sur une colonne avec un tube

de collecte de 2 mL. La colonne a été centrifugée à 8000 rpm pendant 1 min puis transférée dans un nouveau tube. Deux lavages ont été effectués en ajoutant tour à tour 500 μ L de tampon AW1 puis AW2. Finalement, l'ADN fut élué par l'ajout de 200 μ L de tampon AE directement sur la membrane DNeasy puis laissé à température de la pièce pendant 1 min et centrifugé à 8000 rpm pendant 1 min.

PCR

La présence des gènes de virulence pour *hlyA*, *inlB* et *pciB* a été détectée par multiplex en adaptant les méthodes préalablement décrites par Jaradat et coll. (2002) (15), Ericsson et coll. (2000) (16), Vasquez-Boland et coll. (1992) (17) et Blais et Philippe (1993) (18). Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 1. Le mélange pour le PCR contient 4,125 μ L d'eau déionisée stérile (Invitrogène), 2,5 μ L de tampon 10X (Invitrogène), 0,75 μ L de MgCl₂ (Invitrogène), 0,5 μ L de dNTPs (RocheApplied Science), 0,125 μ L de Taq polymérase (5U/ μ L) (Invitrogène), 2,5 μ L de chaque paire d'amorces (10 pmol/ μ L) (Invitrogène) et de 2 μ L d'ADN. Des tubes contrôle ont été inclus avec les échantillons. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur (Biométra, Uno II) dans les conditions suivantes : une dénaturation à 94°C pour 3 min, suivi de 35 cycles de 94°C pour 60 sec (dénaturation), 60°C pendant 120 sec (hybridation) et 72°C pendant 60 sec (élongation). Puis une dernière élongation à 72°C pendant 3 min. Chaque amplicon (10 μ L) a été soumis à une migration électrophorétique à 100 Volts pendant 45 min sur un gel de 1,5% (p/v) d'agarose (Sigma) dans 89mM de Tris, 89mM d'acide borique, 2mM d'EDTA (Fisher Scientific). Le gel a été coloré au bromure d'éthidium et les résultats ont été visualisés sous lumière UV. Des clichés photographiques ont été effectués avec un Polaroid (type 667).

Détermination de la résistance aux antibiotiques des isolats ayant des gènes de virulence

La susceptibilité aux agents antimicrobiens des isolats de *E. coli*, de *S. typhimurium* et de *L. monocytogenes* a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose selon les standards de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (19). Les isolats testés ont été cultivés sur gélose Trypticase soja enrichie de sang de mouton à 5% (Difco). Après 24 heures d'incubation à 35°C, des colonies pures de chaque isolat ont été standardisées par suspension dans de l'eau distillée et ajustées à une turbidité équivalente au standard McFarland 0,5. Ensuite, les inoculums standardisés ont été transférés uniformément sur gélose Mueller Hinton (Difco) sur laquelle les disques contenant les antibiotiques ont été dispersés tout de suite après inoculation. Les antibiotiques utilisés pour effectuer les antibiogrammes sont : Pour *E. coli* et *Salmonella typhimurium* : gentamicine (10µg), tétracycline (30µg), chloramphénicol (30µg), triméthoprim en association avec sulfaméthoxazole (25µg), céphalothine (30µg), ampicilline (10µg), amoxicilline en association avec acide clavulanique (30µg), enrofloxacin (5µg), streptomycine (10µg), cefoxitine (30µg), ceftiofur (30µg). Pour *L. monocytogenes* : rifampicine (10µg), érythromycine (15µg), amoxicilline en association avec acide clavulanique (30µg), ampicilline (10µg), clindamycine (2µg), céphalothine (30µg), gentamycine (10µg), pénicilline G (10 unit/s), tétracycline (30µg), vancomycine (30µg), triméthoprim en association avec sulfaméthoxazole (25µg), chloramphénicol (30µg). Des souches de *E. coli* NTTC 25922 et de *S. aureus* NTTC 25923 ont été ajoutées comme contrôles. Après une incubation de 18 heures à 35°C, les géloses ont été retirées de l'incubateur pour fin de lecture, une règle graduée a été utilisée pour mesurer les zones d'inhibition respectives pour chaque antibiotique.

RÉSULTATS

L'incidence de *L. monocytogenes* sur les carcasses avant pasteurisation, après pasteurisation et après réfrigération a été évaluée à 0,79% (8 cas), 2,59% (26 cas) et 3,09% (31 cas)

respectivement (Tableau 2). Aucune souche de salmonelles n'a été détectée sur les carcasses avant et après pasteurisation. Par contre, une carcasse s'est avérée positive pour *Salmonella* spp. après réfrigération

(Tableau 2). L'incidence des *E. coli* génériques est évaluée à 14,25, 1,79 et 1,59 respectivement avant et après pasteurisation et après réfrigération (Tableau 2).

Tableau 1. Paires d'amorces utilisées pour l'amplification des gènes de virulence des isolats de *L. monocytogenes*

Amorces		Séquence (5'-3')	Tailles du gène (pb)	Localisation sur le gène	Poids du produit (pb)	Références
<i>inlB</i>	F	AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG	1893	922-1067	146	Jaradat et coll. (2002) Ericsson et coll. (2000)
	R	ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG				
<i>plcB</i>	F	GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT	870	463-723	261	Jaradat et coll. (2002) Vasquez-Boland et coll. (1992)
	R	ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT				
<i>hlyA</i>	F	CAT TAG TGG AAA GAT GGA AT	1590	680-1411	730	Blais et Philippe (1993)
	R	GTA TCC TCC AGA GTG ATC GA				

Tableau 2. Prévalence des bactéries pathogènes sur les carcasses avant pasteurisation (AvP), après pasteurisation (ApP) et après réfrigération (ApR)

	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>
	N= 1003	N = 1003	N = 1003
AvP	0 (0,00%)	8 (0,79%)	143 (14,25%)
ApP	0 (0,00%)	26 (2,59%)	18 (1,79%)
ApR	1 (0,099%)	31 (3,09%)	16 (1,59%)

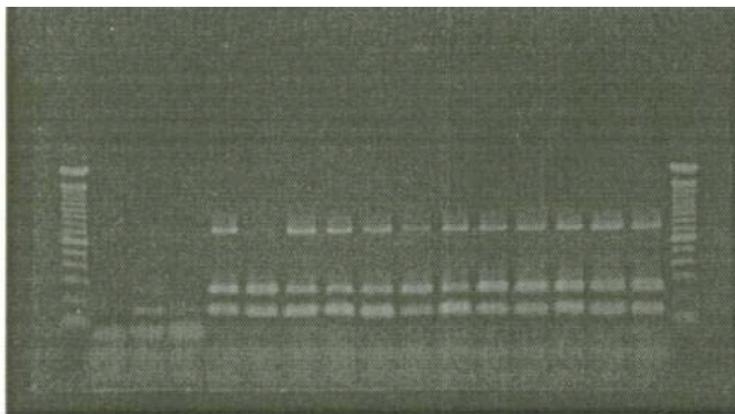
Tableau 3. Pathotype des *E. coli* isolés sur les carcasses des bovins

	Avant pasteurisation	Après pasteurisation	Après réfrigération	Total
Pathotypes	N=143	N=18	N=16	177
Eae	4 (2,79%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	4 (2,26%)
Pap	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0(0,00%)	1 (0,56%)
VT2	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0(0,00%)	1 (0,56%)
AFA	0 (0,00%)	1 (5,55%)	0(0,00%)	1 (0,56%)
Hly-α	3 (2,09%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (1,69%)
Hly-EHEC	0 (0,00%)	1 (5,55%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
CNF	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
Aérobactine	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (12,50%)	2 (1,13%)
CNF+Aéro	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
AFA+Aéro	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
VT2+Hly-EHEC	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (18,75%)	3 (1,69)
VT1+VT2+EHEC	0 (0,00%)	2 (11,11%)	0 (0,00%)	2 (1,13%)
Pap+Aéro	2 (1,40%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (1,13%)
Pap+AFA+Aéro	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
CNF+AFA+Aéro	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
CNF+Pap+Hly-α+Aéro	1 (0,70%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (0,56%)
Total	17 (11,88%)	4 (22,21%)	5 (31,25%)	26 (14,68%)

Tableau 4. Résultats des antibiogrammes sur les isolats d'*E. coli*, de *Salmonella* Typhimurium et de *Listeria monocytogenes*

Antibiotiques	<i>E. coli</i> (N=27)			<i>Salmonella</i> Typhimurium (N=1)			<i>Listeria monocytogenes</i> (N=75)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Gentamicine	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Tétracycline	19 (70%)	0 (0%)	8 (30%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Chloramphénicol	26 (96%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Trimétho./sulfa.*	24 (89%)	0 (0%)	3 (12)	1 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Cépholathine	26 (96%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Ampicilline	24 (89%)	1 (4%)	2 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Amox./Ac.Cl**	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Enrofloxacin	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
Streptomycine	17 (63%)	0 (0%)	10 (37%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	-	-	-
Céfoxitine	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
Ceftiofur	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
Clindamycine	-	-	-	-	-	-	0 (0%)	0 (0%)	75 (100%)
Rifampicine	-	-	-	-	-	-	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Pénicilline G	-	-	-	-	-	-	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Vancomycine	-	-	-	-	-	-	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Erythromycine	-	-	-	-	-	-	75 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

S= sensibilité, I= sensibilité intermédiaire, R= résistance
 * triméthoprime en association avec sulfaméthoxazole
 ** amoxicilline en association avec acide clavulanique



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Figure 1. Amplification par PCR des gènes de virulence de *L. monocytogenes* isolée sur les carcasses de bovins. Les gènes des facteurs de virulence amplifiés sont l'hémolysine (*Listériolysine O*) (*hlyA*) (730 pb), la phosphatidylcholine-spécifique phospholipase C (*pleB*) (261) et l'internaline (*inlB*) (146 pb). De gauche à droite sont représentés : 1) Marqueur 100 pb, 2) Blanc, 3) *Listeria innocua* ATCC 33090, 4) *Listeria ivanovii*, 5) *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, 6) *Listeria monocytogenes* Ci-I, 7) 01-CB-4 B, 8) 01-CB-24 B, 9) 01-CB-38 B, 10) 01-CB-45 C, 11) 01-CB-69 B, 12) 01-CB-82 A, 13) 01-CB-107 A, 14) 01-CB-108 A, 15) 01-CB-109 A, 16) 01-CB-110 A, 17) Marqueur 100 pb

La prévalence des *E. coli* doté d'un ou plusieurs gènes de virulence sur l'ensemble des échantillons de carcasses a été de 14,68%. Cela représente 11,88% des isolats obtenus avant pasteurisation, 22,21% des isolats obtenus après réfrigération et 31,25% des isolats obtenus après réfrigération (Tableau 3).

Tous les isolats de *L. monocytogenes* se sont avérés positifs pour les trois principaux facteurs de virulence qui ont été testés (*hlyA*, *inlB* et *pclB*).

Les résultats des antibiogrammes (Tableaux 4) montrent que certains isolats sont sensibles à tous les antibiotiques, certains montrent une sensibilité intermédiaire et d'autres sont multirésistants. Chez les isolats d'*E. coli* et de *Salmonella typhimurium* la sensibilité vis-à-vis de gentamicine, amoxicilline/acide clavulanique, enrofloxacin, céfoxitine, ceftiofur était de 100%. Par contre, chez les isolats d'*E. coli*, on a observé une résistance vis-à-vis de la streptomycine (37%), la tétracycline (30%), le triméthoprime / sulfaméthoxazole (12%), l'ampicilline (8%), le chloramphénicol (4%) et une sensibilité intermédiaire pour l'ampicilline (4%) et la cépholathine (4%). Pour *Salmonella typhimurium*, on a noté une résistance vis-à-vis du chloramphénicol, de l'ampicilline, de la streptomycine et une sensibilité intermédiaire pour la tétracycline. Tous les isolats de *L. monocytogenes* ont montré une sensibilité complète pour la rifampicine, l'érythromycine, l'amoxicilline/acide clavulanique, l'ampicilline, la cépholathine, la gentamicine, le pénicilline G, la tétracycline, la vancomycine, le triméthoprime/sulfaméthoxazole, le chloramphénicol et une résistance totale à la clindamycine.

DISCUSSION

Les bovins sont considérés comme le réservoir principal des *E. coli* pathogènes, en particulier des vérotoxino-gènes. De ce fait, nous avons évalué la prévalence de certains gènes intervenant dans la virulence de ces dernières. Les résultats montrent une grande variation dans le profil génétique en fonction du temps d'i-

solement. Les gènes *eae* et *hly* sont rencontrés uniquement chez les isolats obtenus avant pasteurisation. Les gènes qui codent pour l'entérohémolysine et les toxines VT1 et VT2 sont plus prévalents chez les isolats obtenus après pasteurisation et après refroidissement. De même que le gène qui code pour l'aérobactine est prédominant chez les isolats obtenus avant pasteurisation. Cette variation dans le profil génétique des *E. coli* suggère que la population est très diversifiée en terme de sérovars, et montre que les bactéries qui possèdent des gènes de virulence sont les plus résistantes aux conditions adverses de l'environnement (20-21), en particulier à certaines températures de la pasteurisation.

Par ailleurs, tous les gènes de virulence portés par ces isolats bovins ont été incriminés seuls ou en groupe dans des cas de pathologie chez les humains (22-23). Les CFA sont responsables de l'attachement des bactéries à la surface de la muqueuse de l'homme. Les fimbriae P (*pap*), les CNF, les AFA et l'aérobactine sont généralement rencontrés chez les souches UPEC, qui sont responsables d'infections du tractus urinaire chez les humains. Les vérotoxines (VT1 et VT2) sont responsables de diarrhées sanguinolentes et du syndrome hémolytique et urémique chez l'humain (24). Le gène qui code, en particulier, pour la synthèse de la toxine VT2 a été détecté après traitement. En plus, ce gène a été détecté simultanément avec celui qui code pour l'entérohémolysine laquelle est rencontrée dans 90% des souches EHEC (25). La présence de deux pathotypes VT2+HlyEHEC après réfrigération suggère que les bovins peuvent être la voie de transmission de VTEC autre que *E. coli* O157:H7 (26).

Tous les isolats de *L. monocytogenes* se sont avérés positifs pour les trois principaux facteurs de virulence recherchés. La présence de gènes de virulence (*hlyA*, *inlB* et *pclB*) révélée par technique de PCR chez les isolats de *L. monocytogenes* suggère que toutes ces souches sont poten-

tiellement pathogènes pour l'homme. En effet, Amoril et Bhunia (1999) (27) ont pu démontrer que les isolats de *L. monocytogenes* provenant des aliments étaient cytopathogènes donc capables d'infecter *in vitro* les tissus animaux. Aucun polymorphisme dans les gènes de virulence de *L. monocytogenes* n'a pu être démontré au cours de cette étude. En général, les produits de PCR des gènes de virulence ne montrent pas de polymorphisme chez *L. monocytogenes* (18) sauf pour le gène *actA*, lequel n'a pas été testé au cours de cette étude. Toutefois, comme toutes les souches proviennent du même abattoir on pourrait penser qu'elles sont génétiquement apparentées.

La résistance aux agents antimicrobiens de souches d'*E. coli* isolées sur des aliments a été documentée dans de nombreuses études (28-29). Les résultats ont démontré en général une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les *E. coli* (30). Les résultats de cette étude ont montré un taux de résistance moyen pour la streptomycine (37%) et la tétracycline (30%), un taux de résistance plus faible pour le triméthoprime/sulfaméthoxazole (12%), l'ampicilline (8%) le chloramphénicol (4%) et une sensibilité intermédiaire pour l'ampicilline (4%) et la céphalothine (4%). Ces résultats concordent avec ceux rapportés par d'autres études qui ont relaté une résistance aux tétracyclines, à la streptomycine, aux sulfamides et à l'ampicilline (28-29). Toutefois, les résultats montrent également que certains antibiotiques tels la gentamicine, l'amoxicilline/acide clavulanique, l'enrofloxacin, la céfoxitine et le ceftiofur gardent une excellente activité contre les *E. coli*. *E. coli* est capable de transférer les résistances acquises aux autres bactéries pathogènes à travers des échanges de plasmides, de transposons ou d'intégrons et vice versa (28, 31). Les *E. coli* pathogènes résistants aux antibiotiques présents dans les aliments constituent une sérieuse menace pour la santé des humains, de par les infections qu'elles engendrent et

surtout par leur capacité à transférer cette résistance aux autres pathogènes alimentaires. Ces résultats supportent donc que la viande de bovins puisse être une source potentielle de transmission d'*E. coli* pathogènes résistantes aux antibiotiques.

S. typhimurium est un pathogène alimentaire en émergence qui, par ses empoisonnements et sa résistance aux antibiotiques, représente une sérieuse menace pour la santé publique (32). Une augmentation de la résistance multiple aux antibiotiques a été rapportée chez certains isolats de *S. typhimurium*, en particulier le phagotype DT104, dans plusieurs pays y compris le Canada (33-35). Cette multirésistance a été notée, entre autres, pour l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracyclines. Les résultats de cette étude montrent que notre isolat de *S. typhimurium* est doté d'un phénotype résistant pour l'ampicilline, le chloramphénicol et la streptomycine et présente une sensibilité intermédiaire aux tétracyclines. Ces résultats confirment l'émergence de souches de *S. typhimurium* multirésistantes aux antibiotiques susceptibles d'être transmises par le biais des aliments contaminés à l'homme (29, 35).

L. monocytogenes est un pathogène alimentaire qui représente une menace pour la santé publique par le fait que cette bactérie continue à croître à la température d'entreposage des aliments. Cette menace pourrait être encore plus importante si ces isolats développaient des phénotypes résistants aux agents thérapeutiques. Généralement, les isolats de *L. monocytogenes* sont réputés sensibles à un spectre assez large d'antibiotiques (36-37). Par contre, de plus en plus de résultats de recherche commencent à relater l'apparition de souches de *L. monocytogenes* résistantes suite à l'acquisition de matériel génétique (plasmides, transposons, intégrons) provenant d'autres bactéries résistantes en particulier du genre *Sta-*

phylococcus (31, 38). Les résultats de cette étude ont montré une sensibilité complète pour tous les antibiotiques testés sauf pour la clindamycine. Les récentes études rapportent en général un taux de résistance à la clindamycine très élevé chez *L. monocytogenes* (35, 37, 38), ce qu'on a pu constater au cours de nos antibiotypies. Néanmoins, ces résultats confirment que les *L. monocytogenes* isolés sur les aliments gardent leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques usuels mais n'écartent pas la possibilité d'émergence de résistance vu que cette dernière peut être acquise dans l'environnement (38).

CONCLUSION

Des bactéries potentiellement pathogènes peuvent être isolées sur les carcasses pasteurisées. Ces bactéries présentent des résistances naturelles et des résistances acquises dues sans doute à la pression de sélection de certains antibiotiques. En un mot, ces résultats confirment donc que les aliments d'origine animale tels la viande de bovins peuvent constituer une source éventuelle de transmission pour l'homme de certaines bactéries potentiellement pathogènes pouvant présenter des résistances naturelles ou acquises aux agents antimicrobiens couramment utilisés pour traiter les infections d'origine alimentaire.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Laurette Bard et Annie Desrosiers pour leur assistance technique ; Ont également contribué à ce travail, Dr Sylvain Quessy, Dr Alain Houde, Marie-Lou Gaucher, Louise Lessard et Danielle Leblanc.

BIBLIOGRAPHIE

- Samelis J., Sofos J.N., Kendall P.A., Smith G.C. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium Dt 104 and *Listeria monocytogenes* in fresh meat decontamination fluids at 4 and 10°C. *J Food Protect*, 2001, vol 64, no 7, p. 950-957.
- Charlebois R., Trudel R., Messier S. Surface contamination of beef carcass by fecal coliforms. *J Food Protect*, 1991, vol 54, p. 960-956.
- Galland, J.C. Risks and prevention of contamination of beef carcasses during the slaughter process in the United States of America. *Rev. Sci. Tech*, 1997, vol 16, p. 395-404.
- Gill C.O., McGinnis J.C., Bryant J. Microbiological contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. *Int J Food Microbiol*, 1998, vol 42, p. 175-184.
- Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture. Pathogen reduction, Hazard Analysis and Critical Control point systems. *Federal Register*, 1996, vol 61, no 144, p. 38805-38889.
- Bolton D.J., Doherty A.M., Sheridan J.J. Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. *Int J Food Microbiol*, 2001, vol 66, no 1-2, p. 119-129.
- Cutter C.N., Rivera-Betancourt M. Interventions for the reduction of *Salmonella* Typhimurium DT 104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. *J Food Prot*, 2000, vol 63, no 10, p. 1326-1332.
- Delmore R.J., Sofos J.N., Schmidt G.R., Belk K.E., Lloyd W.R., Smith G.C. Interventions to reduce microbiological contamination of beef variety meats. *J Food Protect*, 2000, vol 63, no 1, p. 44-50.
- Phebus R.K., Nutsch A.L., Schafer D.E. et coll. 1997. Comparison of steam pasteurisation and other methods for reduction of pathogens on surfaces of freshly slaughtered beef. *J Food Protect*, 1997, vol 60, no 5, p. 476-484.
- Nutsch A.L., Phebus R.K., Riemann M.J. et coll. Evaluation of a steam pasteurisation process in a commercial beef processing facility. *J Food Protect*, 1997, vol 60, no 5, p. 485-492.
- Nutsch A.L., Phebus R.K., Riemann M.J. et coll. Steam pasteurization of commercially slaughtered beef carcasses: evaluation of bacterial populations at five anatomical locations. *J Food Protect*, 1998, vol 61, no 5, p. 571-577.
- Dorsa W.J., Cutter C.N., Siragusa G.R., Koohmaraie M. Microbiol decontamination of beef and sheep carcasses by steam, hot water spray washes, and a steam-vacuum sanitizer. *J Food Protect*, 1996, vol 59, no 2, p. 127-135.
- Gill C.O., Jones T. The microbiological effects of breaking operation on hanging beef carcass sides. *Food Res. Int*, 1999, vol 32, p. 453-459.
- Caya F., Fairbrother J.M., Lessard L., Quessy S. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J Food Protect*, 1999, vol 62, no 7, p. 741-746.
- Jaradat Z.W., Schutze G.E., Bhunia A.K. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int J Food Microbiol*, 2002, vol 76, p. 1-10.
- Ericson H., Unnerstad H., Mattsson J.G., Danielsson-Tham M.L., Tham W. Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the *inlB* gene. *J Med. Microbiol*, 2000, vol 49, p. 73-80.
- Vasquez-Boland, J.A., Kocks C., Dramsi S. et coll. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun*, 1992, vol 60, p. 219-230.
- Blais B., Philippe L. A simple RNA probe system for analysis of *Listeria monocytogenes* polymerase chain reaction product. *Appl Env Microbiol*, 1993, vol 59, no 9, p. 2795-2800.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Inc. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.

- National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. Approved standard M2-A6, 1997, vol 17(31).
20. Rowe M.T., Kirk R.B. Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. *J Food Protect*, 2000, vol 63, no 12, p. 1745-1748.
 21. Harel J., Martin C. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res*, 1999, vol 30, no 2-3, p.131-155.
 22. Orskov F., Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol*, 1992, vol 38, p. 699-704.
 23. Doyle M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol*, 1991, vol 12, no 4, p. 289-301.
 24. Doyle M.P., Zhao T., Meng J., Zhao S. "Escherichia coli O157:H7", in Doyle MP, Beuchat L R, Montville TJ, éd. Food microbiology: Fundamentals and frontiers, ASM Press, Washington, D.C, 1997, p.171-191.
 25. Gyles C.L. "Escherichia coli verotoxins and other cytotoxins", in C.L Gyles, éd. *Escherichia coli* in domestic animals and humans, 1994, CAB International, Guelph, Canada, p. 365-398.
 26. Ganzalez-Garcia E.A. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). *Pol J Vet. Sci*, 2002, vol 2, p. 103-115.
 27. Amoril J.G., Bhunia A.K. Immunological and cytopathogenic properties of *Listeria monocytogenes* isolated from naturally contaminated meats. *J Food Safety*, 1999, vol 19, p. 195-207.
 28. Schroeder C.M., White D.G., Ge B. et coll. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *Int J food Microbiol*, 2003, vol 85, p. 197-202.
 29. White D.G., Zhao S., Sudler R. et coll. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N Engl J Med*, 2001, vol 345, no 16, p. 1147-1154.
 30. Bettelheim K.A., Hornitzky M.A., Djordjevic S.P., Kuzevski A. Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. *J Med Microbiol*, 2003, vol 52, no 2, p. 155-162.
 31. White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDermott P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect*, 2002, vol 4, no 4, p.405-412.
 32. Logue C.M., Sherwood J.S., Olah P.A., Elijah L.M., Dockter M.R. The incidence of antimicrobial-resistant Salmonella spp on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *J Appl Microbiol*, 2003, vol 94, no 1, p. 16-24.
 33. Threlfall E.J., Fisher I.S., Berg-hold C. et coll. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill*, 2003, vol 8, no 2, p. 41-5.
 34. Poppe C., Ziebell K., Martin L., Allen K. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella* Typhimurium DT104 isolates. *Microb Drug Resist*, 2002, vol 8, no 2, p. 107-22.
 35. Yang S.J, Park K.Y, Seo K.S. et coll. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis identified by multiplex PCR from animals. *J Vet Sci*, 2001, vol 2, no 3, p. 181-188.
 36. Prazak A.M, Murano E.A, Mercado I., Acuff G.R. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *J Food Protect*, 2002, vol 65, no 11, p. 1796-1799.
 37. Vela A.I., Fernandez-Garayzabal J.F., Latre M.V., Rodriguez A.A., Dominguez L., Moreno M.A. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, vol 17, no 3, p. 215-220.
 38. Antunes P., Reu C., Sousa J.C., Pestana N., Peixe L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *J Food Protect*, 2002, vol 65, no 12, p. 1888-1893.