

Prévalence de *Yersinia enterocolitica* sur la viande fraîche de porc, de volaille et de bœuf à la distribution en France en 2012

Emilie ESNAULT (1,2), Annie LABBE (1,2), Catherine HOUDAYER (1,2), Martine DENIS (1,2)

(1) ANSES, Unité HQPAP, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

(2) Université Européenne de Bretagne, France

emilie.esnault@anses.fr

***Yersinia enterocolitica* prevalence, on fresh pork, poultry and beef meat at retail level, in France in 2012.**

Y. enterocolitica is a zoonotic agent, and the fourth bacterial cause of human enteritis in Europe. The objective of this study was to assess consumer exposure to the pathogen *Y. enterocolitica* through meat consumption over a one-year period, in France. In this context, the prevalence of *Y. enterocolitica* was established on samples of fresh pork, beef and poultry collected at retail level in France. Of the 649 samples, 4.8% (31) were positive for *Y. enterocolitica*. No significant difference in prevalence between the categories of fresh meat was observed (Chi² test, p=0.09): the prevalence was 4.6 % for pork, 4.5% for poultry and 5.2% for beef meat. However, tongues of pork were highly contaminated by *Y. enterocolitica* (12.5%; Fisher's Exact Test for Count Data, p=0.046) compared to other types of meat.

Although the isolation of *Y. enterocolitica* was carried out by a method promoting the detection of pathogenic biotypes 1B, 2, 3, 4 and 5, only strains carrying biotype 1A were isolated. Strains of biotype 1A are considered non-pathogenic for humans. However, studies indicate that biotype 1A strains isolated from clinical cases have in their genomes genes known to play a role during disease. The presence of the three virulent genes *inv*, *myfA* and *ystB* were tested, the gene *ystB* being strongly related to the clinical biotype 1A. The three genes were detected for some of our strains and 76.9% of our isolates carried the *ystB* gene. Thus, these strains can be potentially pathogenic for humans.

INTRODUCTION

Y. enterocolitica est un agent zoonotique, et le 4^{ème} agent bactérien en Europe responsable d'entérites (EFSA et ECDC, 2013). L'espèce *Y. enterocolitica* comprend six biotypes, le biotype 1A considéré comme non pathogène et les biotypes pathogènes 1B, 2, 3, 4 et 5 (Wauters *et al.*, 1988). Dans la majorité des pays, le biotype 4 est le plus fréquemment isolé. En France, le biotype 4 est isolé dans 69% des cas cliniques humains suivi par le biotype 2 (30%) et le biotype 3 (Savin et Carniel, 2008). Les gènes impliqués dans la virulence ont été caractérisés. Parmi eux, le gène *inv* code l'invasine amenant à l'internalisation des bactéries au niveau des cellules de la barrière intestinale. Les gènes *myfA*, *myfB* et *myfC* permettent l'assemblage de l'antigène Myf et le gène *ystB* code pour une entérotoxine thermostable.

Y. enterocolitica est retrouvée dans l'environnement, dans les denrées alimentaires et sur des animaux (Falcao *et al.*, 2006). Le porc est considéré comme étant le principal réservoir des souches pathogènes de *Y. enterocolitica*. Une enquête d'un an, réalisée par notre laboratoire sur des porcs à l'abattoir, a montré que 74,3% des lots de porcs contenaient au moins un porc positif pour *Y. enterocolitica*. Dans ce contexte, nous avons voulu estimer l'exposition des consommateurs à *Y. enterocolitica* lors de la consommation de viande de porc, de volaille et de bœuf. La présence de gènes de virulence a été recherchée dans les souches isolées au cours de l'étude.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Recherche de *Y. enterocolitica*

649 échantillons de viande crue ont été collectés dans des supermarchés en France.

Les échantillons ont été maintenus à 4°C et analysés dans les 4 jours après prélèvement.

La présence de *Y. enterocolitica* a été recherchée en suivant la méthode ITC, CIN, YeCM décrite par Fondrevez *et al.* (2010).

L'appartenance au genre *Yersinia* a été confirmée par la capacité des souches à dégrader l'urée.

1.2. Détection des gènes de virulence

Après extraction de l'ADN à l'aide du kit QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, USA), les PCRs *ystB* (YstBF : AAA GCG TGC GAT ACT CAG AC ; YstBR : CAG CAT ACC TCA CAA CAC CA; cycle : 95°C 5 min, 34 cycles de 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec), *inv* (cycle : 95°C 5 min, 34 cycles de 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, (Rasmussen *et al.*, 1994) et *myfA* (cycle : 95°C 5 min, 34 cycles de 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec (Kot *et al.*, 2004) ont été réalisées en utilisant le Sybr® Green Jumpstart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri).

Les PCRs ont été effectuées dans un volume réactionnel final de 25µL avec l'appareil de détection PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad, Hercules, California).

2. RESULTATS

Sur les 649 échantillons prélevés, 4,8% (31) étaient positifs à *Y. enterocolitica*. Aucune différence significative de prévalence n'a été observée entre les trois catégories de viande (test du χ^2 , $P=0,9$). La prévalence pour la viande de porc est de 4,6 %, 4,5% pour la viande de volaille et 5,2% pour la viande de bœuf. Parmi les différentes catégories de viande de porc prélevées, la langue de porc présente le taux de contamination le plus élevé (12,5% ; test exact de Fisher, $p=0,046$) (Tableau 1).

Tableau 1 – Détection de *Y. enterocolitica* sur les morceaux de viande de porc

Type de viande	Nbre d'échantillons positifs (nbre total d'échantillons analysés)	Pourcentage d'échantillons positifs
Langue	3(24)	12,5
Viande hachée	5(72)	6,9
Autre morceau	3(141)	2,1

Bien que la méthode d'analyse (enrichissement en ITC) soit préconisée pour la détection d'*Y. enterocolitica* de biotypes pathogènes 2, 3, 4 and 5, seul le biotype 1A a été isolé. Ce biotype est considéré non pathogène pour l'homme. Cependant des études indiquent que des biotypes 1A isolés de cas cliniques ont dans leur génome des gènes de virulence. Pour déterminer si les souches 1A de cette étude possèdent ce type de gènes, des PCRs amplifiant les gènes *inv*, *myfA* et *ystB* ont été réalisées. Bien que la méthode utilisée pour la recherche de *Y. enterocolitica* favorise la détection de souches pathogènes, seules des souches de biotypes 1A ont été isolées.

Tableau 2 – Répartition des gènes de virulence dans les isolats selon la catégorie de viande étudiée.

Catégorie de viande	Nbre de souches	Gènes de virulence		
		<i>myfA</i> Nb de souches (%)	<i>inv</i> Nb de souches (%)	<i>ystB</i> Nb de souches (%)
Porc	12	4 (33,3)	8 (66,7)	6 (50)
Volaille	11	2 (18,2)	8 (72,7)	9 (81,8)
Boeuf	16	0 (0)	9 (56,3)	15 (93,8)
Total	39	6(15,4)	25(64,1)	30(76,9)

Parmi l'ensemble des isolats, seuls cinq ne possèdent aucun des gènes de virulence recherchés. Les gènes *myfA*, *inv* et *ystB* sont détectés avec une incidence de 15,4%, 64,1% et 76,9% respectivement. Les gènes *inv* et *YstB* sont détectés dans les trois catégories de viande fraîche.

Seuls quatre isolats issus de viande de porc et deux isolats issus de viande de volaille portent le gène *myfA* dans leur génome. Ce gène de virulence n'est pas détecté dans les isolats provenant de viande de bœuf.

CONCLUSION

Cette étude a montré la présence de *Y. enterocolitica* dans les trois catégories de viandes fraîches. La prévalence varie de 4,5% pour la viande de volaille à 5,2% pour la viande de bœuf, toutefois ces écarts ne sont pas significatifs.

La prévalence est plus faible que celle observée en Italie par Bonardi *et al.* (2010), qui détectent un taux de contamination de 15,2% pour la viande de porc et 32,5% pour la viande de volaille. Dans notre étude, les morceaux de langue de porc présentent un taux de contamination élevé (12,5%) par rapport aux autres morceaux de viande de porc. Cela est cohérent avec le portage de *Y. enterocolitica*, qui est particulièrement présent dans la cavité orale des porcs (Thibodeau *et al.*, 1999).

La grande majorité des isolats collectés à partir de denrées alimentaires sont de biotype 1A (Bonardi *et al.*, 2010), ce qui est cohérent avec nos résultats. En effet, aucun isolat de biotype pathogène n'a été isolé dans cette étude et ce bien que la méthode de détection favorise l'isolation des biotypes pathogènes. Comme dans les études précédentes, le génotype prédominant est *inv+* et *ystB+*.

La présence de *ystB* a été fortement corrélée aux souches cliniques de biotype 1A et il est retrouvé dans 76,9% des souches dans notre étude. La détection des trois gènes de virulence *ystB*, *inv* et *myfA* parmi les souches de biotype 1A rend compte de leur potentiel pathogène.

En conclusion, notre étude indique que les viandes de porc, volaille et bœuf sont faiblement contaminées par *Y. enterocolitica*. Bien que seules des souches de biotypes 1A aient été isolées, certaines de ces souches possèdent des gènes impliqués dans la virulence. Le gène *ystB* associé à des souches de biotype 1A isolées de cas cliniques, a été détecté dans la majorité des souches isolées dans cette étude.

Le risque lié à la présence de ces souches ne doit pas être ignoré et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer leur pouvoir pathogène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonardi S., Paris A., Bassi L., Salmi F., Bacci C., Riboldi E., Boni E., D'Incau M., Tagliabue S., Brindani F., 2010. Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J. Food Prot.*, 73, 1785-1792.
- EFSA et ECDC, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 11(4), 3129, 250.
- Falcao J.P., Falcao D.P., Pitondo-Silva A., Malaspina A.C., Brocchi M., 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J. Med. Microbiol.*, 55, 1539-1548.
- Fondrevez M., Labbe A., Houard E., Fravallo P., Madec F., Denis M., 2010. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. *J. Microbiol. Methods*, 83, 244-249.
- Kot B., Trafny E.A., 2004. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. *Pol. J. Vet. Sci.*, 7, 27-31.
- Rasmussen H.N., Rasmussen O.F., Andersen J.K., Olsen J.E., 1994. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. *Mol. Cell Probes*, 8, 99-108.
- Savin C., Carniel E., 2008. Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 400, 49-58.
- Thibodeau V., Frost E.H., Chenier S., Quesy S., 1999. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. *Can. J. Vet. Res.*, 63, 96-100.
- Wauters G., Goosens V., Janssens M., Vandepitte, J., 1988. New Enrichment Method for Isolation of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3 from Pork. *App. Env. Method.*, 54, 851-854.