

## Isolement du sérotype O:5,27 de *Yersinia enterocolitica* à partir d'une langue porcine au Maroc

Hakim KARIB<sup>1</sup>□, Javier YANGÜELA<sup>2</sup> & Antonio HERRERA<sup>2</sup>

(Reçu le 04/03/1998 ; Accepté le 13/10/1998)

عزل *يرسينيا أنتروكوليتكا* صنف مصلي 0:5,27 من لسان الخنزير لأول مرة بالمغرب

اهتم هذا البحث بدراسة المميزات البيوكيميائية، وبقدرية توليد المرض ومقاومة المضادات الحيوية بالنسبة لعثرة *يرسينيا أنتروكوليتكا* صنف مصلي 0:5,27 تم عزلها من لسان الخنزير، وقد أظهرت النتائج أن العثرة السالفة الذكر تنتمي إلى الصنف الحيوي 3، كما بينت امتحانات توليد المرض عن خطورة هذه العثرة لإمكانها تسبب المرض عند الإنسان، كما لوحظ أن العثرة حساسة لعدد من المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : *يرسينيا أنتروكوليتكا* صنف مصلي 0:5,27 - لسان الخنزير - أول عزل بالمغرب

### Isolement du sérotype O:5,27 de *Yersinia enterocolitica* à partir d'une langue porcine au Maroc

Une souche de *Yersinia enterocolitica* sérotype O:5,27, isolée à partir d'une langue de porc apparemment saine, a été étudiée pour ses caractéristiques biochimiques, antibiotiques et de pathogénicité. La souche de biotype 3 répond à toutes les épreuves de virulence utilisées. Du point de vue antibiogramme, elle s'est avérée sensible à de nombreux antibiotiques.

**Mots clés :** *Yersinia enterocolitica* sérotype O:5,27 - Premier isolement - Langue porcine - Maroc

### Isolation of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:5,27 from a porcine tongue in Morocco

A strain of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:5,27 isolated from a healthy pig tongue was studied for biochemical, virulence and antibiogram characteristics. The isolate was biotype 3 and showed positive reactions with all virulence tests used. It was sensitive to many antibiotics.

**Key words :** *Yersinia enterocolitica* serogroup O:5,27 - First isolation - Porcine tongue - Morocco

<sup>1</sup> Département d'Hygiène et d'Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B. P. 6202- Instituts. 10101 Rabat, Maroc

<sup>2</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza C/ Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

## INTRODUCTION

Le genre *Yersinia* est constitué d'un groupe de bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs et qui partagent un certain nombre de caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques avec les autres genres de la Famille des *Enterobacteriaceae*. Ce genre est composée de 11 espèces dont trois (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*) sont réputées pathogènes pour l'homme.

*Y. enterocolitica* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée chez les patients. Le premier isolat de cette espèce chez l'homme a été décrit en 1939 par Schleifstein & Coleman. Dans les deux dernières décennies, une augmentation importante de la fréquence d'isolement de ce micro-organisme à partir d'échantillons cliniques et non cliniques a été remarquée.

Actuellement, *Y. enterocolitica* constitue une cause majeure de maladies gastro-intestinales chez l'homme. La yersiniose humaine est associée à des désordres gastro-intestinaux tels que l'entérite, l'iléite terminale et la lymphadénite mésentérique. Occasionnellement, la maladie peut se manifester par l'arthrite et la septicémie (Schiemann, 1989).

*Y. enterocolitica* a été isolée également chez les animaux domestiques et sauvages, les rongeurs, les oiseaux et les insectes. La voie de transmission la plus fréquente est représentée par les aliments bien que la transmission peut se faire par contact direct de personne à personne.

*Y. enterocolitica* a été détectée dans l'eau, les fruits de la mer, le lait, les végétaux, les viandes (porcine, bovine, ovine, équine, cameline et de volaille) (Farmer *et al.*, 1992 ; Karib *et al.*, 1995). Le principal facteur de risque de yersiniose est représenté par la consommation d'eau et d'aliments crus, mal cuits ou recontaminés. De nombreux chercheurs incriminent le porc en tant que réservoir majeur mais non exclusif de sérotypes de *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'homme. Les bovins et les camelins peuvent également héberger des souches pathogènes et constituent une source de la maladie.

Actuellement, sont connus plus de 50 sérotypes de *Y. enterocolitica* mais uniquement 5 (0:1,2 a ; 0:3 ; 0:5,27 ; 0:8 et 0:9) sont habituellement considérés comme pathogènes pour l'homme. Il existe une corrélation étroite entre les sérotypes pathogènes

et la distribution géographique. En Europe, au Japon et au Canada; les souches isolées chez les patients appartiennent aux sérotypes 0:3 et 0:9, alors qu'aux Etats-Unis, ce sont les sérotypes 0:8 et 0:5,27 qui prédominent (Schiemann, 1989).

Le sérotype 0:5,27 a été isolé à partir de la viande et des produits carnés principalement d'origine porcine. Il a été incriminé également lors d'une épidémie à *Y. enterocolitica* au Wisconsin suite à la consommation du lait cru (Moustafa *et al.*, 1983).

## MATÉRIEL & MÉTHODES

L'isolement de *Y. enterocolitica* sérotype 0:5,27 a été réalisé à partir de la langue d'un porc, apparemment sain, et sacrifié dans les abattoirs de Rabat. La souche a été isolée au cours d'une étude antérieure sur l'incidence de *Y. enterocolitica* dans les carcasses et les langues porcines (Karib *et al.*, 1995).

Après un double écouvillonnage de la langue, les deux écouvillons sont introduits dans un tube de tampon phosphate salin qui sera incubé pendant 3 semaines à 4°C. Après cette phase d'enrichissement sélectif, 0,1 ml du bouillon d'enrichissement est ensemencée à la surface de la gélose CIN (Cefsulodine - Irgasin- Novobiocine) (Merck) incubée à 28°C/24 h.

Les colonies sélectionnées sur la gélose CIN sont inoculées dans la gélose Kligler (Difco) et le milieu urée selon Christensen (Difco) durant 24 h à 28°C. La différenciation biochimique de l'espèce a été faite selon Bercovier *et al.* (1980) et le biotypage selon le schéma proposé par Wauters *et al.* (1987). Le sérotypage de *Y. enterocolitica* a été réalisé par le Professeur Wauters (Unité de Microbiologie, Université Catholique de Louvain, Bruxelles) en utilisant les antisérums de lapin pour la détermination des facteurs 1 à 57 de l'antigène 0. Les tests de pathogénicité qui ont été utilisés sont les suivants:

### • Auto-agglutination (AA)

Le test AA est réalisé selon la méthode décrite par Laird & Cavanaugh (1980), en utilisant deux tubes de bouillon MR-VP (Difco) et en incubant l'un à 25°C et l'autre à 37°C pendant 24 h. La souche est initialement repiquée sur la gélose typticase soja à 28°C pendant 48 heures. Les souches pathogènes agglutinent à 37°C mais pas à 25°C. Les souches qui agglutinent dans les deux températures sont considérées comme non pathogènes.

### • Activité de la pyrazinamidase (PYZ)

La recherche de la PYZ est effectuée selon la technique de Kandolo & Wauters (1985). La pyrazinamide carboxique et le Tris-maleate ont été fournis par la Société Merck, Darmstad. La réaction est révélée après addition de quelques gouttes de sulfate ferreux ammoniacal à 1 % au bout de deux jours d'incubation. Une réaction positive se traduit par une couleur brune rouille qui indique la présence d'acide pyrazinoïde qui réagit avec le fer au cas où il se produit une décarboxylation de la pyrazinamide carboxique amidase. Une réaction négative du test indique que la souche est potentiellement pathogène.

### • Dépendance vis-à-vis du Calcium (CAD)

La CAD selon Gemski *et al.* (1980) est mise en évidence à 37°C après 24h d'incubation sur la gélose à l'oxalate de magnésium (MOX) et interprétée selon les recommandations de Riley & Toma (1989). La souche qui produit des colonies de petite taille sur la gélose MOX comparativement à celle ensemencée sur la gélose trypticase de Soja est considérée comme dépendante vis-à-vis de calcium.

### • Fixation du rouge Congo (RC)

L'absorption de rouge Congo est examinée sur le milieu à l'oxalate de magnésium et au rouge Congo décrit par Riley & Toma (1989). Ce milieu sert également pour la mise en évidence de la dépendance vis-à-vis du calcium. La souche RC et CAD positive produit des colonies rougeâtres de petite taille. La production de colonies larges et incolores indique une réaction négative du test.

### • Absorption du Cristal violet (CV)

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par Bhaduri *et al.* (1987). Les souches positives donnent des colonies de petite taille et de couleur violette intense.

### • Agglutination de microbilles de latex (LPA)

La LPA est mise en évidence selon la technique de Lachica & Zink (1984). Les microbilles de latex d'une taille de 5,6µm (E.F. Fullam, Inc., New York), sont diluées dans une solution saline (0,9%) de pH 7,2 afin d'obtenir une concentration de  $3.10^8$  microbilles/ml. Une réaction positive se traduit par une agglutination rapide au bout de 5 secondes.

### • Test d'agrégation des sels (SAT)

Ce test est effectué selon la méthode de Qadri *et al.* (1988). L'agglutination sur lame est réalisée en mélangeant 25 ml des différentes suspensions bactériennes (densité de  $5.10^9$  cfu/ml) et le sulfate d'ammonium aux molarités suivantes: 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 1,0 ; 2,0 et 4,0.

### • Résistance à l'effet bactéricide du sérum (SR)

Ce test est réalisé selon la technique décrite par Pai & De Stephano (1982) en utilisant le sérum humain. Les dénombrements sont déterminés au temps 0 et 2 heures suite à l'addition à l'inoculum de 10 % de sérum humain normal. La souche est résistante au sérum si le nombre de bactéries montre une baisse d'au moins 5 unités logarithmiques au bout de 2 heures. La souche considérée sensible ne survit pas normalement après deux heures d'exposition au sérum. Avant utilisation, le sérum est testé pour les agglutinines contre *Y. enterocolitica* serogroupe 0:5,27 selon la méthode décrite par Adesiyun *et al.* (1986). Le titre doit être inférieur ou égal à 1:16 pour tous les antigènes testés.

### • Fermentation des sucres

La salicine et l'esculine sont des beta-glucosides habituellement utilisés pour la détermination de la pathogénicité potentielle de *Y. enterocolitica*. La fermentation de la salicine est déterminée sur le bouillon de base pour la fermentation des sucres (Difco) additionné à 1 % de salicine et de l'indicateur bleu de bromothymol. Pour l'hydrolyse de l'esculine, un bouillon contenant 5 g de peptone, 1 g de monophosphate de potassium, 5 g d'esculine, 0,5 g de citrate ferrique, 10 ml de l'indicateur d'Andrade et 990 ml d'eau distillée est utilisé. La souche est inoculée et incubée à 25°C pendant 2 jours. La souche est considérée comme potentiellement pathogène si elle est négative vis-à-vis de l'esculine et de la saline (Farmer *et al.*, 1992).

### • Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité de la souche à différents antibiotiques a été étudiée sur la gélose Iso-sensitest (Oxoid) par la méthode standardisée de diffusion sur gélose. Les antibiotiques utilisés sont l'amikacine (30 mcg), l'amoxicilline (20 mcg), l'ampicilline (10 mcg), la carbénicilline (100 mcg),

la céfamandole (30 mcg), la céfotaxime (30 mcg), la céfoxitine (30 mcg), la céphalothine (30 mcg), le chloramphénicol (30 mcg), la cloxacilline (1 mcg), la colistine (10 mcg), l'érythromycine (15 mcg), la fosfamycine (50 mcg), la gentamycine (10 mcg), la kanamycine (30 mcg), la mezlocilline (75 mcg), l'acide nalidixique (30 mcg), la néomycine (30 mcg), la pénicilline G (10 unités), la streptomycine (10 mcg), la sulfadiazine (300 mcg), les tétracyclines (30 mcg), la tobramycine (10 mcg) et la triméthoprime (25 mcg). Les zones d'inhibition sont mesurées et la souche est classée résistante, sensible ou intermédiaire.

## RÉSULTATS & DISCUSSION

Les caractéristiques biochimiques et de pathogénicité ainsi que l'activité vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés de la souche de *Y. enterocolitica* sérotype 0:5,27 figurent dans les tableaux 1, 2 et 3. Les caractères biochimiques de base de la souche ne diffèrent pas de ceux décrits pour *Y. enterocolitica* dans Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984).

**Tableau 1. Caractéristiques biochimiques de la souche de *Yersinia enterocolitica* sérotype 0:5,27 isolée au Maroc**

Test	Résultat
<b>Biotype</b>	
Lipase (Tween - esterase)	-
Esculine/Salicine, 24 h	-/-
Indole	-
D-xylose	+
Tréhalose	+
Réduction des nitrates	+
Pyrazinamidase	-
β-D-Glucosidase	-
Voges Proskauer	+
Proline peptidase	-
<b>Autres caractères biochimiques</b>	
Uréase	+
Production d'H <sub>2</sub> S	-
β-Galactosidase	+
Ornithine décarboxylase	+
Lysine décarboxylase	-
Arginine dihydrolase	-
Citrate (Simmons)	-
Phénylalanine désaminase	-
Mobilité à 28°C/37°C	+/-
Croissance sur la gélose contenant 0,1 % de chlorure de Calcium et de désoxycholate et 3 % de citrate	+
Cellobiose, sorbitol, maltose	+
Méllibiose, rhamnose, raffinose	-
Sacharrose, sorbose	+

**Tableau 2. Tests de pathogénicité de la souche de *Yersinia enterocolitica* sérotype 0:5,27 isolée au Maroc**

Test	Résultat
Auto-agglutination	+
Activité de la pyrazinamidase	-
Dépendance vis-à-vis du calcium	+
Fixation du rouge Congo	+
Absorption du cristal violet	+
Agglutination de microbilles de latex	+
Agrégation des sels	+
Résistance à l'effet bactéricide du sérum	+
Salicine/esculine	-/-

**Tableau 3. Antibiogramme de la souche de *Yersinia enterocolitica* sérotype 0:5,27 isolée au Maroc**

Antibiotique	Charge	Rés.	Antibiotique	Charge	Rés.
Amikacine	30 mcg	S	Fosfamycine	50 mcg	S
Amoxicilline	20 mcg	I	Gentamycine	10 mcg	S
Ampicilline	10 mcg	R	Kanamycine	30 mcg	S
Carbénicilline	100 mcg	R	Mezlocilline	75 mcg	R
Céfamandole	30 mcg	R	Acide nalidixique	30 mcg	S
Céfotaxime	30 mcg	R	Néomycine	30 mcg	S
Céfoxitine	30 mcg	R	Pénicilline G	10 unités	R
Céphalothine	30 mcg	R	Streptomycine	10 mcg	S
Chloramphénicol	30 mcg	S	Sulfadiazine	300 mcg	R
Cloxacilline	1 mcg	R	Tétracyclines	30 mcg	S
Colistine	10 mcg	S	Tobramycine	10 mcg	S
Erythromycine	15 mcg	R	Triméthoprime	25 mcg	S

(S: sensible; R: résistant; I: intermédiaire; Rés. Résultat)

Selon les caractères biochimiques retrouvés, la souche est de biotype 3 et répond parfaitement à tous les facteurs liés à la virulence. Il s'agit donc d'une souche hautement pathogène. Concernant la résistance de la souche vis-à-vis des antibiotiques, ce résultat coïncide pleinement avec celui rapporté par Karib *et al.* (1994) pour le sérotype pathogène 0:3 de *Y. enterocolitica*.

Il est également similaire au résultat signalé par Yangüela (1986) à l'exception de l'antibiotique céfotaxime. Cet auteur a analysé des sérotypes de *Y. enterocolitica* non pathogènes. Cependant, notre résultat diffère de celui de Black *et al.* (1978) qui a rapporté une grande sensibilité de 36 souches de *Y. enterocolitica* sérotype 0:8 (isolées au cours d'un foyer de toxi-infection) aux β-lactames (ampicilline et céphalothine) et une résistance intermédiaire à la carbénicilline.

L'isolement de *Y. enterocolitica* 0:5,27 à partir de la viande porcine au Maroc constitue le premier isolement en Afrique étant donné que jusqu'à l'heure actuelle et à notre connaissance, ce sérotype n'a été isolé qu'aux Etats-Unis (Moustafa *et al.*, 1983), en Allemagne (Aleksic *et al.*, 1988) et au Japon (Fukushima *et al.*, 1990).

Il est important de noter que l'isolement du sérotype 0:5,27 a été effectué à partir d'une carcasse porcine reconnue salubre pour la consommation publique après inspection vétérinaire. Le porc est considéré comme un des principaux réservoirs des sérotypes de *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'homme (Karib *et al.*, 1995) et logiquement comme une importante source de ce micro-organisme. Plusieurs enquêtes épidémiologiques ont montré que le porc en tant qu'animal de boucherie constitue une source majeure de l'infection humaine. Les mêmes sérotypes ont été isolés de manière répétitive chez les personnes malades et à partir des fèces de porcs vivants dans le même environnement. La colonisation du tube digestif du porc est fortement liée au niveau d'hygiène général de l'élevage. Les porcelets nouveaux nés se contaminent pendant les trois premières semaines de la vie et restent porteurs sains. Les adultes sans exprimer la moindre manifestation clinique de l'infection, excrètent le germe pendant 3 à 7 semaines après inoculation expérimentale avec le sérotype 0:5,27 et montrent une protection croisée entre les sérotypes 0:5,27 et 0:3 après réinoculation avec le 0:3 (Schiemann, 1989). La rareté des yersiniose humaines dans les pays islamiques peut être expliquée en partie par la non consommation de la viande porcine par les musulmans.

La contamination de l'homme par *Y. enterocolitica* est consécutive à l'ingestion des aliments ou de l'eau, par contact direct avec les animaux porteurs sains mais aussi de personne à personne. Au Maroc, l'abattage et la préparation des animaux de boucherie se font parfois sous des conditions défectueuses d'hygiène favorisant ainsi une contamination de la viande par les matières fécales (Karib *et al.*, 1995).

*Y. enterocolitica* pathogène a été isolée dans différents pays du monde mais avec une fréquence élevée dans les pays à climat froid. Cependant, cette étude confirme que le sérotype pathogène 0:5,27 pourrait être impliqué dans les gastroentérites dans les pays à climat chaud.

Tenant compte de la littérature scientifique, cette souche de *Y. enterocolitica* 0:5,27 constitue le premier isolement de ce sérotype au Maroc. La souche étant pathogène, cet isolement a donc une haute signification de point de vue santé publique.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr. Aziz Marhaben, Directeur des abattoirs de Rabat pour son aide précieuse pour la réalisation de ce travail, et le Professeur George Wauters de l'Unité de Microbiologie, Université Catholique de Louvain, Bruxelles pour la confirmation biochimique et sérologique de la souche.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Adesiyun A.A., Lombin L.H. & Agbonlahor D.D. (1986) Prevalence of antibodies to *Y. enterocolitica* serogroups 0:3, 0:8, and 0:12,26 in domestic animals in Nigeria. *Br. Vet. J.* 142 : 381-388
- Aleksic S., Bockemühl J., Wuthe H.H. & Aleksic V. (1988) Occurrence and clinical importance of the pathogenic serogroup 0:5,27 of *Yersinia enterocolitica* in the Federal Republic of Germany and methods for its serological and bacteriological identification. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 269 : 197-204
- Bercovier H., Brenner D.J., Ursing J., Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Alonso J.M., Carter G.A. & Mollaret H.H. (1980) Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. *Curr. Microbiol.* 4 : 201-206
- Bhaduri S., Conway L.K. & Lachica R.V. (1987) Assay of Crystal violet for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Y. enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 1039-1042
- Black R.E., Jackson R.J., Tsai M., Medveski M., Shayegani M., Feeley J.C., Mc Lead K.I. & Wakelee A.M. (1978) Epidemic *Y. enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med.* 298: 76-79
- Farmer J.J., Carter G.P., Miller V.L., Falkow S. & Wachsmuth I.K. (1992) Pyrazinamidase, CR- MOX, salicin fermentation- esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Y. enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 2589-2594
- Fukushima H., Maruyama K., Omori I., Ito K. & Iorihara M. (1990) Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughterhouse. *Fleischwirtsch.* 70 : 1300-1302

- Kandolo K. & Wauters G. (1985) Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* 21 : 980-982
- Karib H., El Marrakchi A., Blanco D., Yanguela J & Herrera A. (1994) Aislamiento de *Y. enterocolitica* serogrupo 0:3 en Marruecos de una canal porcina: biotipado, antibiograma, caracteres bioquímicos y de virulencia. *Med. Vet.* 11 : 437-444
- Karib H., Boussatta H. & Seeger H. (1995) *Yersinia enterocolitica* : occurrence in slaughtered pigs, raw beef and chicken in Morocco. *Fleischwirtsch. International* 2 : 81-82
- Lachica R.V & Zink D.L. (1984) Determination of plasmid-associated hydrophobicity of *Y. enterocolitica* by a latex particle agglutination test *J. Clin. Microbiol.* 19 : 660-663
- Laird W.J. & Cavanaugh D.C. (1980) Correlation of auto-agglutination and virulence of *Yersinia*. *J. Clin. Microbiol.* 11 : 430-432
- Moustafa M.K., Ahmed A.A. & Marth E.H. (1983) Occurrence of *Y. enterocolitica* in raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 46 : 276-278
- Pai C.H. & De Stephano L. (1982) Serum resistance associated with virulence in *Y. enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35 : 605-611
- Qadri F., Hossain S.A. & Ciznar I. (1988) Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in *Shigella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1343-1348
- Riley G. & Toma S. (1989) Detection of pathogenic *Y. enterocolitica* by using Congo red- magnesium oxalate agar medium. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 213-214
- Schiemann D.A. (1989) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in "Foodborne bacterial pathogens". Ed. Doyle M.P. Marcel Dekker, INC. New York. pp. 601-659
- Schleifstein J.I. & Coleman M.B. (1939) An unidentified micro-organism resembling *Bacterium ligniersi* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *New York State J. Med.* 39 : 1749-1753
- Wauters G., Kandolo K. & Janssens M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol* 9 : 14-21
- Yangüela J. (1986) Estudio sobre aislamiento e identificación de *Yersinia enterocolitica* en productos carnicos. Tesis Doctoral, Fac. Med. Vet., Zaragoza