

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

THÈSE

**Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Microbiologie

par Fanny SAVOYE

le 28 Mars 2011

**Optimisation du protocole de recherche des
Escherichia coli Producteurs de Shiga-toxines
(STEC) dans les aliments**

Directeur de thèse : Monsieur le Pr Jean Guzzo

Co-directeur de thèse : Madame le Dr Delphine Thevenot-Sergentet

JURY :

RAPPORTEUR : Madame Christine Martin, Directrice de recherche, INRA Theix

RAPPORTEUR : Madame Marie-Christine Montel, Directrice de recherche, INRA Aurillac

EXAMINATEUR : Monsieur Fabrice Martin-Laurent, Directeur de Recherche, INRA Dijon

EXAMINATEUR : Madame Christine Rozand, Professeur, BioMérieux, Marcy l'Etoile

EXAMINATEUR : Madame Delphine Thevenot-Sergentet, Maître de Conférence, VetAgro Sup

EXAMINATEUR: Monsieur Jean Guzzo, Professeur, Université de Bourgogne - Dijon

Remerciements à...

Messieurs et Mesdames les membres du jury :

Monsieur le Professeur Jean Guzzo, mon Directeur de thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour avoir encadré ce travail de thèse avec autant de disponibilité, ainsi que pour ses nombreux conseils avisés. Je suis reconnaissante de la confiance qu'il m'a accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues.

Madame le Docteur Delphine Thevenot-Sergentet, ma co-Directrice de thèse. Je tenais chaleureusement à la remercier pour son soutien durant la thèse et son accueil au sein du laboratoire. Qu'elle reçoive toute l'expression de ma reconnaissance pour son encadrement, ses précieux conseils et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Je la remercie aussi pour son aide à la réalisation de ce mémoire.

Madame le Professeur Christine Rozand, qu'elle reçoive toute l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et, pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude. Qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Mesdames les Professeurs Marie-Christine Montel et Christine Martin d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je suis reconnaissante pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail et je tiens à leurs exprimer à cet égard mes sincères remerciements.

Monsieur Fabrice Martin-Laurent, qu'il reçoive toute l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de ce jury et pour l'intérêt porté à ce travail. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements.

Je remercie...

Monsieur Vincent Atrache, sans qui je ne me serais jamais lancée dans une telle aventure. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir initié ce travail avec le soutien financier de la **société BioMérieux**.

La R&D Microbiologie Industrielle (BioMérieux) et plus particulièrement, **Jean-Louis Pittet, Christine Aguilhon, Cécile Sauvan, Aurélie Lafay**, pour leur précieux conseils et pour m'avoir accompagné tout au long de ce projet ; mais aussi **Cathy, Myriam, Rémy, Anita, Florence et les autres** pour leur accueil et les bons moments passés ensemble.

L'équipe de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle :

- ☛ **Marion**, mon « binôme ». Merci pour ton aide et ton soutien permanent, ta bonne humeur, les fous rires et les bons moments qu'on a passés ensemble.
- ☛ **Delphine**, pour ta patience, ton soutien et l'ambiance dans laquelle j'ai pu travailler ces trois années.
- ☛ **Lysiane et Stéphane**, mes voisins de bureau, pour tous les bons moments partagés autour de la peau de Shrek...
- ☛ **Les Christine's**, pour nos conversations cuisine, fleurs et jardins.
- ☛ **Audrey, Sarah, Franck, Françoise, Cécile, Patrice, Manuelle, Estelle, Brigitte** pour leur sympathie, leur aide technique et pour la bonne ambiance qui règne dans l'unité.

Un grand merci à vous tous pour m'avoir permis de mener à bien ce projet. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et vous assure mon amitié.

A l'équipe de QSA : Alain Gonthier, Sylvie Mialet et plus particulièrement **Pierre Demont** pour m'avoir fait confiance et permis de m'essayer au métier de l'enseignement.

Une pensée particulière pour...

Mes **Parents**, sans qui, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Mes **Soeurs, Cindy, Marjory et Lucy** pour leur soutien et toute la complicité qui nous unit.

Thomas, qui depuis des années partage ma vie, mes doutes et mes joies. Je le remercie de sa présence à mes côtés dans les bons comme dans les moments plus difficiles, ses encouragements, sa compréhension et, tout simplement son amour.

Toute ma **Famille** et tous mes **Amis** qui me sont chers...

Résumé

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des agents pathogènes importants émergents en santé publique. Ces bactéries sont à l'origine des épidémies de colites hémorragiques et de syndrome hémolytique et urémique (SHU). La grande majorité des cas est liée à la consommation d'aliments contaminés par un type particulier de STEC appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) parmi lesquels on trouve les sérogroupes définis comme pathogènes par l'AFSSA : O26, O103, O111, O145 et O157.

Les bovins ont depuis longtemps été identifiés comme un important réservoir de STEC. Bien que la transmission des STEC à l'homme soit fréquemment associée à la consommation de viande, les produits laitiers ont également été impliqués dans les cas humains. Le développement de méthodes rapides pour la détection des STEC les plus impliqués en pathologie humaine est donc essentiel pour assurer la sécurité des produits alimentaires. Cependant, la détection des STEC dans les aliments est problématique principalement en raison de la diversité des sérogroupes de STEC et de l'absence de caractéristiques biochimiques communes permettant de les distinguer des autres *E. coli*.

L'objectif de cette thèse était d'optimiser le protocole de détection des STEC dans les aliments de manière à pouvoir proposer aux industriels des protocoles leur permettant une réelle maîtrise du « danger STEC » dans leur filière.

Pour se faire, nous sommes intervenus à différentes étapes du protocole. Nous avons notamment sélectionné un milieu d'enrichissement permettant la détection des *E. coli* O26 dans les fromages au lait cru : EPT+ acriflavine + CT. Nous avons également évalué les performances d'une méthode de détection des *E. coli* O157:H7 (VIDAS ECPT UP) dans la viande de boeuf. Cette nouvelle technique est basée sur l'utilisation de protéines recombinante de phage qui ciblent spécifiquement les *E. coli* O157. A travers cette étude, nous avons démontré la possibilité d'avoir des temps d'enrichissement minimales pour l'analyse d'échantillon de 25g (6h) et la faisabilité d'analyser des échantillons de 375g avec un ratio de dilution de 1/4 et un enrichissement de 24h. Enfin nous nous sommes intéressés à l'étape de confirmation en mettant au point un test d'immuno-concentration automatisé (utilisant des protéines de phages spécifiques de nos bactéries cibles) permettant d'immuno-concentrer les 5 sérogroupes les plus connus de STEC (O26, O103, O111, O145 et O157) en une seule fois.

Mots-clés : STEC, aliments, détection, pathogène.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are an important subset of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) associated with foodborne infections. These bacteria can cause hemorrhagic diarrhoeal disease and Haemolytic and Uremic Syndrome which are associated with some predominant serotypes defined by AFSSA institute: O26, O103, O111, O145 and O157.

Cattle are the primary reservoir of STEC. Although STEC transmission to humans is frequently associated with consumption of meat, dairy products have also been implicated in human cases. Sensitive and rapid detection methods for STEC are essential for the food industry to ensure a safe food supply. However, the detection of STEC in foods is problematic because it's an heterogeneous group which displays a broad range of both genotypic and phenotypic differences.

The aim of this PhD work was to optimize the research protocol of STEC strains in food in order to provide some protocols to the industries for improving risk management protocol.

We choosen to study different steps of the protocol: The first one was the enrichment of *E. coli* O26 allowing their detection in raw milk cheeses after 24 h enrichment in EPT+ acriflavine + cefixime-tellurite. Then, we evaluated the VIDAS ECPT UP performances' for the detection of *E. coli* O157: H7 in raw ground beef. Through this study, we showed the ability to reduce enrichment time for sample analysis of 25g (6h) and the feasibility of analyzing samples of 375g with a sample to broth ratio of 1/4 after 24h enrichment. Thereafter we looked at the confirmation step. We developed and optimized automated VIDAS immuno-concentration of *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 (VIDAS ESPT) with the use of recombinant phage proteins for capture.

Keywords: STEC, food, detection, pathogenic.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	9
------------------------------	---

Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Liste des annexes	14
INTRODUCTION.....	15
Mémoire bibliographique.....	19
CHAPITRE 1 : Généralités relatives aux <i>Escherichia coli</i> producteurs de shiga-toxines (STEC).....	20
1. Données taxonomiques.....	20
1.1. L'espèce <i>Escherichia coli</i>	20
1.2. Classification des <i>E. coli</i> responsables des troubles intestinaux.....	21
1.3. Phylogénie des STEC pathogènes.....	25
2. Facteurs de virulence des STEC pathogènes	27
2.1. Les Shiga-toxines	27
2.2. Les facteurs d'adhésion.....	28
2.3. Les facteurs plasmidiques	30
2.4. Autres facteurs de virulence	31
3. Pathologies associées aux EHEC.....	31
3.1. La colite hémorragique.....	31
3.2. Le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique).....	32
3.3. Le PTT (Purpura Thrombotique Thrombocytopénique).....	32
4. Physiologie des STEC.....	33
4.1. Facteurs influençant la multiplication des STEC.....	33
4.2. Différence entre <i>E. coli</i> O157 :H7 et les STEC	36
5. Epidémiologie humaine.....	36
5.1. Epidémiologie descriptive.....	36
5.2. Sources et réservoirs.....	37
5.3. Les modes de transmission.....	42
6. Principales épidémies	45
CHAPITRE 2 : Recherche de <i>E. coli</i> O157 :H7 et des STEC dans les aliments	48

1. Les matrices alimentaires	50
1.1. Les produits laitiers	50
1.2. La viande de bœuf	51
2. L'échantillonnage	52
3. L'enrichissement des matrices alimentaire.....	56
3.1. Généralités.....	56
3.2. Le volume du bouillon d'enrichissement	56
3.3. Les différents milieux utilisés	57
3.4. Les températures et la durée d'incubation.....	58
4. Les différentes méthodes de détection	59
4.1. La détection des <i>E. coli</i> O157 :H7	59
4.2. La détection des autres STEC	73
5. L'étape de confirmation.....	77
5.1. L'immuno-séparation magnétique (IMS).....	77
5.2. L'immuno-concentration <i>E. coli</i> (ICE)	78
5.3. Les différents milieux d'isolement.....	78
6. Les méthodes validées	82
6.1. Pour O157	82
6.2. Les autres.....	84
Mémoire expérimental.....	86
CHAPITRE 1 : Matériel et méthodes.....	88
1. Les souches.....	89
2. Les matrices alimentaires utilisées au cours de l'étude	91
2.1. Les produits laitiers	91
2.2. Les produits carnés.....	92
2.3. Ensemencement expérimental des matrices	92
3. Les milieux sélectifs	94
4. Les différents kits VIDAS utilisés	94
5. La Real Time PCR (RT-PCR).....	95
6. L'IMS	100
Résultats.....	101

CHAPITRE 2: Optimisation de la phase d'enrichissement pour la détection des <i>E. coli</i> O26 et O157 dans les fromages au lait cru français.....	102
1. Introduction	102
2. Résumé	103
3. Publication n°1.....	104
4. Conclusion.....	112
CHAPITRE 3 : Evaluation des performances du VIDAS ECPT UP pour la recherche des <i>E. coli</i> O157 dans la viande de boeuf	114
1. Introduction	114
2. Résumé	115
3. Publication n°2.....	116
4. Conclusion.....	124
CHAPITRE 4 : Mise au point d'un test permettant l'immuno-concentration de 5 sérogroupes de <i>E. coli</i> (VIDAS ESPT)	126
1. Introduction	126
2. Etude préalable à l'élaboration des cônes 5 sérogroupes.....	127
2.1. La technologie : des protéines de phage.....	127
2.2. Détermination des concentrations nécessaires dans le cône	128
2.3. Performances des cônes coatés avec les phages par rapport à ceux avec les anticorps et choix des concentrations optimales.	129
3. Evaluation du nouveau test d'immuno-concentration.....	130
3.1. Résumé	130
3.2. Publication n°3	131
3.3. Conclusion.....	132
Discussion et perspectives.....	147
Annexes	159
Références bibliographiques	171
Liste des abréviations	

AFNOR = Association Française de NORmalisation
AFSSA = Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AOAC = Association of Official Analytical Chemists
A/E = attaching and effacing
BET = Bromure d’Ethidium
BHI = Brain Heart Infusion (bouillon coeur-cerveille)
CT = Céfixime-Tellurite
DGAL = Direction Générale de l’Alimentation
EFSA = European Food Safety Authority
EHEC = *Escherichia coli* entero-hémorragique
ELFA = Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPT = Eau Peptonnée Tamponnée
FDA = Food and Drug Administration
ICE = Immuno-Concentration *E.coli* O157
ICMSF = International Commission on Microbial Specifications for Foods
IMS = Immunomagnetic separation
ISO = Organisation Internationale de Normalisation
PCR = Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PTT = purpura thrombotique thrombocytopénique
RFV = Relative Fluorescence Value
RT-PCR = PCR en temps réel
SHU = Syndrome Hémolytique et Urémique
STEC = *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines
TSB = Tryptone Soya Broth
UFC = Unité Formant Colonie
VTEC = verotoxin producing *E. coli*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux caractères permettant la différenciation des espèces du genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i>).....	20
Tableau 2 : Fréquences observées de produits contaminés par des STEC.	38
Tableau 3 : Fréquences observées de produits contaminées par <i>E. coli</i> O157 :H7.	39
Tableau 4 : Fréquences de carcasses de bovins contaminées par <i>E. coli</i> O157 :H7 et niveaux de contamination (Vimont, 2007).	40
Tableau 5 : Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC (Vimont, 2007).....	41
Tableau 6 : Les principales épidémies à STEC.....	45
Tableau 7 : Probabilité de détecter <i>E. coli</i> O157:H7 dans un hachoir en fonction de la prise d'essai réalisée.....	55
Tableau 8 : Méthodes validées AFNOR pour la détection des <i>E. coli</i> O157.....	84
Tableau 9 : Méthodes validées AFNOR pour la détection des <i>E. coli</i>	85
Tableau 10 : Souches utilisées lors des études 1 et 2.....	91
Tableau 11 : Technologies fromagères et matrices fromagères utilisées	92
Tableau 12 : Composition du mix de RT-PCR	96
Tableau 13 : Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour la RT-PCR (Nielsen and Andersen, 2003 ; Perelle <i>et al.</i> , 2004)	99
Tableau 14 : Performances des protéines de phage aux concentrations choisies.	129

Liste des figures

Figure 1 : Pathogénie associée aux six classes de <i>E. coli</i> responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998).	22
Figure 2 : Définition des STEC et EHEC au sein des <i>E. coli</i>	24
Figure 3 : Modèle hypothétique de l'émergence de <i>E. coli</i> O157:H7 basé sur les mutations dans le gène <i>uidA</i> , la production de Shiga-toxines, ainsi que les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase (Feng <i>et al.</i> , 1998).	27
Figure 4 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Extrait de Vernozy-Rozand et Montet, 2001).	28
Figure 5 : Flux potentiels de STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003).	43
Figure 6 : Protocole simplifié de recherche des STEC	49
Figure 7 : Test VIP EHEC	61
Figure 8 : L'automate VIDAS avec des cônes et des barrettes.....	62
Figure 9 : Principe du VIDAS.....	63
Figure 10 : Les automates d'extraction d'acides nucléiques EASYMAG de bioMérieux (à gauche) et EZ1 d'Applied Biosystems (à droite).	66
Figure 11 : Schéma du mécanisme d'action des sondes Taqman	67
Figure 12 : Automate BAX® system Q7	70
Figure 13 : Automate et disque Genesystems.....	71
Figure 14 : Automate chromo4 à gauche et automate Miniopicon à droite.....	72
Figure 15 : Kit HQS <i>E. coli</i> O157:H7 commercialisé par la société ADNucleis	73
Figure 16 : Projet de normalisation d'une méthode de recherche des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.	76
Figure 17 : Projet de normalisation : protocole de recherche des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.	77
Figure 18 : Colonie d' <i>E. coli</i> sur milieu Coli ID (bioMérieux)	79
Figure 19 : Colonie d' <i>E. coli</i> sur le milieu Rapid' <i>E. coli</i> 2 (BIO-RAD)	79
Figure 20 : Colonie d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur milieu MacCONKEY	79
Figure 21 : Colonie d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur milieu ChromID O157:H7.....	80
Figure 22 : Colonie d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur milieu BBL CHROMagar O157.....	80

Figure 23 : Protocole de recherche des <i>E. coli</i> O157 dans les aliments suivant la norme NF EN ISO 16654.	83
Figure 24 : A gauche schéma du plasmide utilisé, à droite, apparence des colonies sur gélose PCA supplémentée en ampiciline.	90
Figure 25 : Protocole d'inoculation des matrices.....	93
Figure 26 : Colonies O26, O103, O111 et O145 sur la gélose B. Possé.	94
Figure 27 : Protocole d'utilisation du VIDAS ECPT.....	95
Figure 28 : Cycle d'amplification de la RT-PCR : a) pour <i>eae</i> et les sérogroupes ; b) pour <i>stx</i> 1 et 2.	98
Figure 29 : Schéma de la réaction d'immuno séparation magnétique.	100
Figure 30 : Les différentes parties d'un bactériophage	128
Figure 31 : Protocole d'évaluation de la sensibilité	129
Figure 32 : Protocole d'évaluation de la spécificité.....	129

Liste des annexes

Annexe 1: Méthodes validées AOAC pour la recherche de <i>E. coli</i> O157 & H7 (http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html).....	160
Annexe 2 : Méthodes validées AOAC pour la recherche des <i>E. coli</i> et autres coliformes. (http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html).....	162
Annexe 3: Souches utilisées au cours de l'étude concernant le VIDAS ESPT.....	163
Annexe 4: Optimization of raw milk an raw milk products enrichment step before <i>E.coli</i> O26 detection. D.Thevenot, M.Bouvier, A.Gleizal, F.Savoie and C.Vernozy-Rozand.....	164
Annexe 5: Novel phage ligand based methode for same day detection of <i>E.coli</i> O157:H7 in composite sample of raw ground beef. D.Thevenot, M.Bouvier, A.Gleizal, F.Savoie and C.Vernozy-Rozand.....	165
Annexe 6: Novel phage ligand based enzyme linked fluoesencent assay for same day detection of <i>E.coli</i> O157:H7 in composite sample of raw ground beef and trimmings. C. Vernozy-Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal, F. Savoie, D. Thevenot.....	166
Annexe 7: Novel phage ligand based enzyme linked fluoesencent assay for same day detection of <i>E.coli</i> O157:H7 in environment and feed samples. C. Vernozy-Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal, F. Savoie, D. Thevenot.....	167
Annexe 8: Evaluation of novel recombinant phage protein ligand assay for <i>E.coli</i> O157:H7 detection in raw ground beef and trimmings.F.Savoie, C.Rozand, M.Bouvier, A.Gleizal, D.Thevenot.....	168
Annexe 9: Novel Phage Immuno concentration assay for isolation of <i>E.coli</i> O26, O103, O111, O145 et O157. F.Savoie, M.Bouvier, JL.Pittet, C.Aguilhon D.Thevenot.....	169
Annexe 10: Immuno concentration assay for isolation of STEC strains. F.Savoie, M.Bouvier, JL.Pittet, C.Aguilhon D.Thevenot.....	170

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des hôtes communs de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). La majorité des souches d'*E. coli* sont commensales, mais certaines ont toutefois été associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl, 1993). Parmi celles-ci, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme des pathogènes émergents importants en santé publique. Ils peuvent être à l'origine de diarrhées souvent sanglantes. Dans certains cas, des complications peuvent apparaître telles qu'un syndrome hémolytique et urémique parfois mortel, notamment chez les enfants en bas âge, ou un purpura thrombotique thrombocytopénique chez l'adulte.

Depuis 1982, les STEC ont été à l'origine de nombreux cas d'infections humaines à travers le monde, essentiellement consécutives à la consommation d'aliments contaminés d'origine animale (e.g. viande hachée, lait et fromages au lait cru, ...). Toutefois, l'épidémiologie des infections à STEC a évolué durant ces dix dernières années, et l'ingestion de légumes et fruits contaminés ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine.

Le sérotype O157:H7 est le plus communément retrouvé en clinique humaine mais d'autres sérogroupes comme O26, O103, O111 et O145 sont de plus en plus incriminés lors d'épidémies. Ils représentent donc un danger pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agro-alimentaires.

Dernièrement, la France a fait face à deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) importantes : une première en octobre 2005, liée à *E. coli* O157:H7 incriminant de la viande hachée de boeuf (Mailles *et al.*, 2006), et une seconde en décembre 2005, due à la consommation de fromages au lait cru contaminés par *E. coli* O26 (Espié *et al.*, 2006). Cette année, une épidémie liée à *E. coli* O26 dans de la viande de bœuf est survenue au Etats-Unis ainsi qu'une autre liée à *E. coli* O145 dans de la laitue (CDC, 2010).

Ainsi, l'avis de l'AFSSA de juillet 2008, et plus récemment, l'avis de janvier 2011 (2010-SA-0031) définit comme souche STEC pathogène, les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7 et ayant des caractéristiques génétiques particulières (elles doivent posséder au moins deux facteurs de virulence précis).

Cependant, en dépit des différents éléments soulignés dans les lignes précédentes, il n'existe à l'heure actuelle, qu'un protocole officiel destiné à rechercher *E. coli* O157 dans les denrées alimentaires : il s'agit de la méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157

dans les aliments (NF EN ISO 16654). Ceci se justifie par le fait que le sérotype O157 :H7 a été le plus incriminé dans les épidémies recensées dans le monde. C'est pourquoi un grand nombre de méthodes commercialisées permettant la détection de ce sérotype est validé AFNOR à ce jour. En revanche, aucune méthode permettant la détection des *E. coli* non-O157 n'est validée.

Le protocole de recherche des bactéries pathogènes dans les aliments, et plus précisément des STEC pathogènes repose sur quatre grandes étapes : la prise d'essai ou échantillonnage, l'enrichissement (phase pendant laquelle les bactéries cibles vont se multiplier), la détection et enfin la confirmation (étape essentielle si la présence de la bactérie est suspectée). Ainsi, les divers protocoles de recherche utilisés actuellement dans les industries et les laboratoires de diagnostic varient principalement, d'une part, en fonction des procédures d'échantillonnage mises en oeuvre et, d'autre part, en fonction des protocoles d'enrichissement et méthodes de détection employés.

Il se posait alors la question de savoir comment optimiser des protocoles de détection appropriés aux 5 sérogroupes pointés du doigt par l'AFSSA afin de garantir une réelle sécurité des denrées commercialisées vis-à-vis des STEC. Il paraissait donc important et indispensable de disposer d'éléments de réponse concrets par rapport à cette interrogation, de manière à pouvoir proposer aux industriels et aux laboratoires de routine des recommandations pertinentes pour la détecter de ces bactéries dans les aliments.

Avant d'exposer les résultats de notre étude, objet du mémoire expérimental, il convient de replacer ce travail dans son contexte scientifique général, développé dans le mémoire bibliographique.

La synthèse bibliographique est successivement consacrée à des rappels généraux sur *E. coli* O157:H7 et les STEC non-O157:H7, puis à la physiologie et l'épidémiologie des STEC. Une dernière partie concernant la recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC-non O157:H7 dans les aliments est abordée.

L'étude expérimentale reprend l'ensemble des travaux qui ont été entrepris afin d'optimiser la recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 dans les denrées alimentaires et les matrices environnementales. Les étapes de notre étude sont les suivantes :

- L'optimisation de l'étape d'enrichissement des *E. coli* O26 dans les fromages au lait cru pour permettre leur détection par une méthode automatisée : le VIDAS EES.
- L'évaluation des performances de deux méthodes automatisées de recherche des *E. coli* O157:H7, l'une génétique : la PCR en temps réel (RT-PCR) et l'autre immunologique : le VIDAS ECPT UP. Ces méthodes ont été comparées à la méthodes de référence (IMS : Séparation immuno-magnétique) pour une recherche dans différents échantillons de viande de bœuf (prise d'essai de 25 ou 375 g).
- La mise au point d'un test immunologique automatisé permettant l'immuno-concentration des 5 sérogroupes majeurs de *E. coli* (VIDAS ESPT) en utilisant une technologie nouvelle : les protéines de phage.

Les résultats expérimentaux sont exposés sous la forme de 3 publications et de communications affichées et présentées lors de congrès internationaux.

Mémoire bibliographique

CHAPITRE 1 : Généralités relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC)

1. Données taxonomiques

1.1. L'espèce *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* a été décrite pour la première fois en 1885 après avoir été isolée dans des selles de nourrissons par l'allemand Theodor Escherich. Son nom actuel lui est ensuite donné en 1919 par Castellani et Chambers (Grimont, 1987).

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* ou encore *Shigella* appartiennent également à cette famille. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990).

Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques particulières, permettant de les différencier (Grimont, 1987) (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux caractères permettant la différenciation des espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*).

Caractéristiques	<i>E. coli</i> non O157 :H7	<i>E. coli</i> O157 :H7	<i>E. hermanii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Indole	+	+	+	-	+
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
β-xylosidase	-	-	-	+	-
β-glucuronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+

(+), positif pour la majorité des souches ; +/-, positif ou négatif selon les souches; LDC, Lysine Décarboxylase ;
ODC, Ornithine Décarboxylase.

Escherichia coli fait partie de la microflore commensale intestinale de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud. Il représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988). A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (e.g. *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157 :H7...).

Bien que la majorité des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl., 1993) bien connues des médecins. Différents pathotypes intestinaux ont été mis en évidence en fonction des facteurs de pathogénicité et des signes cliniques engendrés. Ils seront décrits dans le paragraphe qui suit.

1.2. Classification des *E. coli* responsables des troubles intestinaux

A l'heure actuelle, il n'existe pas de classification standardisée des souches appartenant à l'espèce *E. coli*. Les médecins utilisent une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes (Figure 1):

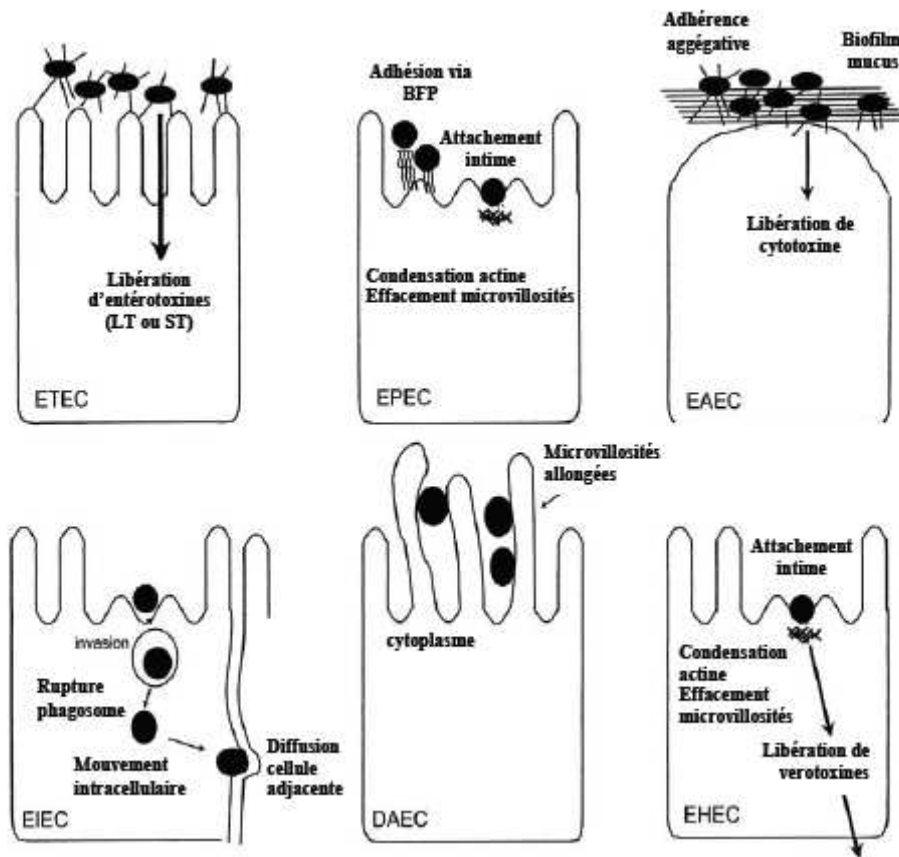


Figure 1 : Pathogénie associée aux six classes de *E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998).

☛ Les *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC)

Ils sont majoritairement associés à deux syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur. Ils sont présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle et leur pouvoir pathogène s'explique par la sécrétion de toxines thermostables et/ou thermolabiles (Levine, 1987).

☛ Les *E. coli* Enteropathogènes (EPEC)

Ils sont responsables de diarrhées infantiles et touchent en particulier les enfants en bas âge (<3 ans). Des lésions histopathologiques apparaissent lors d'infections. Ces lésions sont appelées lésions d'attachement et d'effacement (Andrade *et al.*, 1989). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence de l'intimine entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions. (Jerse *et al.*, 1990).

☛ **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)**

Ils sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que les pays industrialisés. Ils présentent un phénotype d'adhésion aux cellules Hep-2 proche de celui des EPEC mais toutefois différent puisqu'il s'agit d'une adhérence diffuse (Vial *et al.*, 1988).

☛ **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)**

Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en dysenterie. Ils sont biochimiquement et génétiquement assez proches de *Shigella spp* (Brenner *et al.*, 1973), tout comme leur pathogénie (invasion de l'épithélium intestinal).

☛ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)**

Ils sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse » sur les lignées cellulaires en culture (Benz et Schmidt, 1992 ; Cookson et Nataro, 1996).

☛ **Les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC)**

Ils sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley *et al.*, 1983). Les EHEC qui sont des souches isolées chez les malades, possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx1* codant pour la Shiga-toxine 1 ou *stx2* codant pour la Shiga-toxine 2) (Konowalchuk *et al.*, 1977 ; O'Brien *et al.*, 1980) ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* (Levine et Edelman, 1984). L'ensemble des souches d'*Escherichia coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC selon l'ancienne dénomination internationale [verotoxin-producing *E. coli*]). Il est important de souligner néanmoins que tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme (Figure 2).

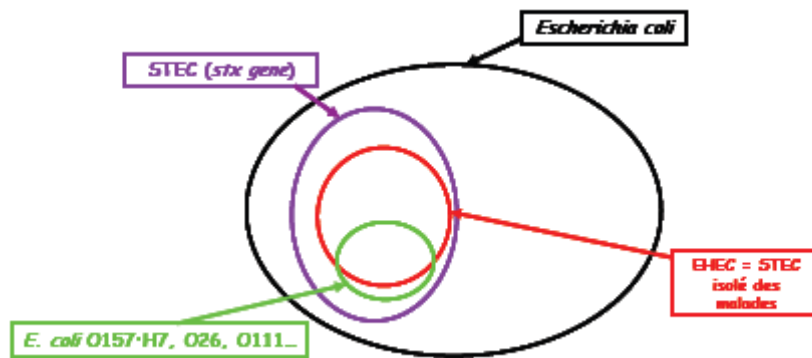


Figure 2 : Définition des STEC et EHEC au sein des *E. coli*.

Les microbiologistes préfèrent opter pour une classification fondée en grande partie sur les travaux de Kauffmann (1947) et basée sur :

-(1) la détermination du sérogroupe. Depuis 1947, le sérogroupe est caractérisé par l'identification des antigènes somatique « O ». L'antigène « O » fait partie du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Plus de 180 sérogroupe « O » d'*E. coli* sont actuellement connus.

-(2) la détermination, au sein du sérogroupe, du sérotype. Le sérotype est caractérisé par l'identification des antigènes complémentaires aux structures présentes à la surface des bactéries comme les antigènes « H » du flagelle et les antigènes « K » de la capsule. La diversité des antigènes « H » est due aux différents types de flagelline composant la structure du flagelle. Rappelons que c'est le flagelle qui permet la mobilité bactérienne.

Tout au long de ce mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement aux *E. coli* Producteurs de Shiga Toxine (STEC), responsables de pathologies plus ou moins graves lorsqu'elles sont ingérées par l'homme. Aujourd'hui, il n'existe pas de définition scientifique consensuelle relative aux STEC pathogènes. Aux Etats-Unis ainsi qu'au Canada, seul le sérotype O157:H7 fait l'objet d'une recherche systématique dans les denrées alimentaires à risque et notamment la viande hachée de bœuf. Le Japon, quant à lui, incite à la détection du sérotype O157:H7 mais également des sérogroupe O26 et O103 dans les aliments à risque. En France, depuis la recommandation de l'AFSSA en date d'avril 2006 et plus récemment du 15 juillet 2008, la situation est plus claire puisqu'une définition des souches STEC pathogènes a été indiquée au gestionnaire du risque représenté par la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.

Selon cette recommandation, une souche STEC pathogène doit avoir les caractéristiques suivantes :

- elle doit appartenir aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 ;
- elle doit de surcroît posséder concomitamment, deux facteurs de virulence : un ou deux gènes *stx* codant pour les *Shiga-toxines*, et le facteur d'attachement et d'effacement *eae* avec les variants suivants : *eae*-gamma pour O157 et O145, *eae*-beta pour O26, *eae*-epsilon pour O103 et *eae*-theta pour O111.

Cependant, de plus en plus de scientifiques considèrent cette définition comme trop restrictive. En effet, prenons pour exemple une *E. coli* appartenant au séro groupe O26 possédant les facteurs de virulence *eae* et *stx* mais sans le flagelle H11 : cette bactérie n'est pas considérée comme une STEC pathogène selon la définition de l'AFSSA. Pourtant, elle possède les facteurs de virulence susceptibles d'entraîner une pathologie chez l'homme Il s'agit d'une vraie question de santé publique sur laquelle le laboratoire communautaire de référence (européen) travaille.

1.3. Phylogénie des STEC pathogènes

- Origine des EHEC

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC. Les EHEC seraient un groupe de clones dérivant des *E. coli* Entéropathogènes (EPEC) (Whittam *et al.*, 1993). Des gènes comme le gène d'attachement et d'effacement (*eae*) auraient été transférés d'une souche pathogène à une souche de *E. coli* commensale, qui serait devenue à son tour pathogène.

L'analyse moléculaire et la comparaison de la distribution des gènes spécifiques de virulence ont montré que les EHEC auraient probablement acquis récemment la plupart de leurs facteurs de virulence par transfert horizontal de matériel génétique. L'explication logique de l'émergence des EHEC comme un agent pathogène majeur serait la présence de ces gènes sur des éléments mobiles, comme les gènes *stx1* et *stx2* situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de pathogénicité LEE et le gène *ehxA* et *katP* (entérohémolysine-EHEC, KatP) sur le plasmide EHEC (pO157), qui auraient été transmis horizontalement en différentes étapes.

L'acquisition des gènes *stx* par deux clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures de EHEC : EHEC-1, constituée de souches de *E. coli* O157, et EHEC-2, constituée de souches de *E. coli* O26 et O111 (Sperandio *et al.*, 1998; Wieler *et al.*, 1997).

- Origine du clone de *E. coli* O157:H7

Feng *et al.* (1998) ont proposé un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7. Ce modèle est basé sur des événements intervenus à partir de l'ancêtre génétiquement le plus proche des EHEC O157:H7 : le sérotype EPEC O55:H7 (β -glucuronidase positive et fermentant le sorbitol) (Figure 3). Ces deux lignées auraient émergé il y a au moins trente mille ans, à partir d'un ancêtre commun possédant l'îlot de pathogénicité LEE. Selon ce modèle, la première étape à l'origine de la séparation des deux lignées aurait été l'acquisition du gène *stx2* vraisemblablement par transduction avec des phages. Il en résulterait l'émergence d'un clone O55:H7 *stx2*-positif puis, plus tard l'acquisition d'un plasmide codant des hémolysines et la région *rfb* (nécessaire à la synthèse de l'antigène O157), modifiant l'antigène O55 en O157, et plus récemment un gène de Shiga-toxine 1 (*stx1*). Ce clone aurait perdu plus récemment encore la capacité à fermenter le sorbitol et à produire une activité β -glucuronidase fonctionnelle, par une mutation T->G en position 92 du gène *uidA* (Park *et al.*, 2001). Puis il aurait également acquis le plasmide de virulence pO157 et aurait donné naissance au clone O157:H7 "sorbitol -" de répartition mondiale (Feng *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2000).

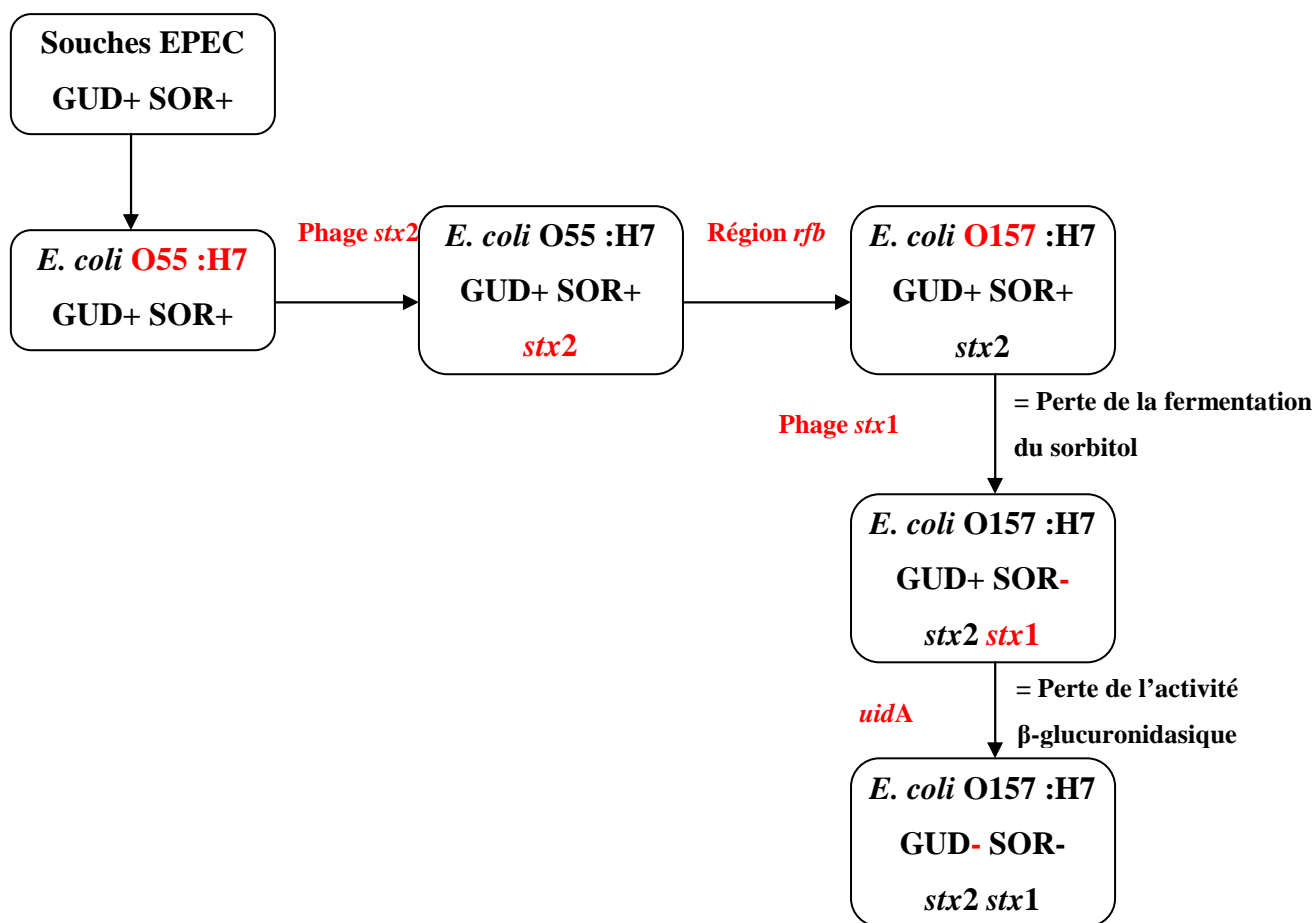


Figure 3 : Modèle hypothétique de l'émergence de *E. coli* O157:H7 basé sur les mutations dans le gène *uidA*, la production de Shiga-toxines, ainsi que les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase (Feng *et al.*, 1998).

2. Facteurs de virulence des STEC pathogènes

2.1. Les Shiga-toxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines capables d'inhiber *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (Slt) étant donné leurs homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982; Strockbine *et al.*, 1988).

- Structure

Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. La sous-unité A possède une activité de type N-glycosidase qui permet l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée. Les deux sous-unités A et B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type λ -like. L'opéron *stx* est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B. Les gènes de la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, ressemblant par leurs structures et leurs fonctions à Stx1, sont situés quant à eux, sur le chromosome (Gannon *et al.*, 1990).

- Variants

On considère deux grandes classes de Shiga-toxines : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Calderwood *et al.*, 1996; Strockbine *et al.*, 1986). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologies au niveau de la séquence en acides aminés avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Strockbine *et al.*, 1988). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas traverser de la même façon la barrière de l'épithélium intestinal (Hurley *et al.*, 1999). En outre, des études (Lindgren *et al.*, 1993; Wadolowski *et al.*, 1990b) ont montré que Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits (Beutin *et al.*, 2007). Au sein de la classe des toxines Stx2, 11 variants (Brett *et al.*, 2003) sont à l'heure actuelle différenciés, dont les variants Stx2 NV206 et Stx2g qui ont été récemment décrits (Leung *et al.*, 2003 ; Bertin *et*

al.,2001). Concernant la classe des toxines Stx1, les variants sont moins divers puisqu'ils sont au nombre de 6, les plus fréquents étant Stx1, Stx1c et Stx1d. Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs (Calderwood *et al.*, 1996). D'autres variants ont été mis en évidence sur la base de différences au niveau de la séquence nucléotidique des gènes (Fremaux *et al.*, 2007).

- Mécanismes d'action

Lors d'une première étape, la toxine se fixe à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- α (1-4)-galactose- β (1-4)-glucosyl-céramide) (Lingwood *et al.*, 1987). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose et subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme, exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al.*, 1999), conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire (Figure 4). Le récepteur Gb3 ne serait apparemment pas le seul impliqué dans le mécanisme d'action des Shiga-toxines. En effet, une récente étude a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 dans un système de culture d'organe *in vitro* (IVOC). Cependant, le mécanisme impliqué reste à l'heure actuelle inconnu (Schuller *et al.*, 2004).

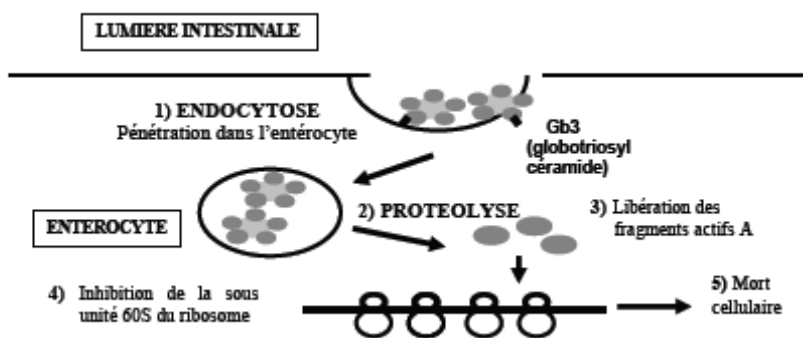


Figure 4 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Extrait de Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

2.2. Les facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénicité. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de 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).

La colonisation du tube digestif par certaines souches de STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum (Donnenberg *et al.*, 1993). Les lésions A/E, d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Cet effacement est dû à une dépolymérisation des filaments d'actine constitutifs des microvillosités (Ismaili *et al.*, 1995). Il s'en suit une accumulation et une repolymérisation d'actine pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections.

Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, l'adhésion des STEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips et Frankel, 2000).

- Le système de sécrétion de type III

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (Locus of Enterocyte Effacement), codant un système de sécrétion particulier, le système de type III, et trois classes de protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci :

- Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) code une protéine de membrane externe de 94 kDa appelée intimine (Jerse *et al.*, 1991). La fonction "adhésion" de l'intimine est assurée par les 280 acides aminés situés en C-terminal. Cette région est constituée de 2 domaines "Ig-like" assurant la reconnaissance du récepteur spécifique Tir présent à la surface de la cellule cible, ainsi que d'un récepteur eucaryote non clairement identifié.

- Le gène *tir* code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce à un système de sécrétion de type III (Kenny *et al.*, 1997). Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (DeVinney *et al.*, 1999).

- Les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une « seringue » moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, *espF*, *espG*, *espH* ...).

- Le système de sécrétion de type III : les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de type III dont les gènes sont également portés par le LEE. Ce système est codé par les gènes *sep* (secretion of *E. coli* protein) et *esc* (*E. coli* secretion) (Jarvis et Kaper, 1996).

A noter que dans un souci de concision, les éléments concernant, d'une part, la régulation de l'expression des gènes du LEE et, d'autre part, les autres facteurs d'adhésion observés, ne seront pas abordés ici.

2.3. Les facteurs plasmidiques

- L'entérohémolysine

L'entérohémolysine E-hlyA a été mise 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). Ce gène présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l' α -hémolysine d'*E. coli* K12. C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines Rtx (Repeats in Toxin), et son mécanisme d'action est comparable à celui de l' α -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). Elle permettrait notamment de stimuler le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies. Cependant, l'activité de E-hlyA est moins puissante que celle de l' α -hémolysine ; en effet, le phénotype hémolytique des STEC se caractérise par une lyse des érythrocytes de mouton sur gélose au sang plus discrète et plus lente (Beutin *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1995). De plus les souches isolées chez les malades ne possèdent pas toujours ce gène, et sa présence n'est pas statistiquement corrélée au pouvoir pathogène.

- Autres facteurs plasmidiques

Une sérine protéase EspP capable de cliver le facteur V de coagulation humain et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité (Brunner *et al.*, 1997). La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients.

D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la pathogénie : la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi que le système de sécrétion de type II (Brunner *et al.*, 1996; Burland *et al.*, 1998). Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC (Savarino *et al.*, 1996; Schmidt et Karch, 1996; Morabito *et al.*, 1998; Iyoda *et al.*, 2000). Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

2.4. Autres facteurs de virulence

Le gène *astA* codant l'entérotoxine EAST1 a été mis en évidence chez plusieurs souches de STEC (Iyoda *et al.*, 2000, Morabito *et al.*, 1998 ; Savarino *et al.*, 1996). Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse. La survie des bactéries dans les aliments et au niveau de l'estomac correspond à une étape importante du processus infectieux. L'étude de souches de sérotype O157:H7 a montré leur capacité à survivre dans des aliments acides tels que la mayonnaise, le jus de pomme, la viande (Abdul-Raouf *et al.*, 1993 ; Glass *et al.*, 1992 ; Zhao *et al.*, 1993). Plusieurs mécanismes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence chez *E. coli* O157:H7 : un système oxydatif, un système arginine-dépendant et un système glutamate-dépendant (Choi *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 1996 ; Price *et al.*, 2000). Des études ont montré que la résistance aux conditions acides, mais également à la chaleur et à la salinité, dépendait entre autres du régulateur général de réponse au stress codé par le gène *rpoS* (Cheville *et al.*, 1996 ; Price *et al.*, 2000).

3. Pathologies associées aux EHEC

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr, 1995).

3.1. La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 (Griffin et Tauxe, 1991; Tarr, 1995). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante (Griffin et Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). Des nausées, des vomissements, des céphalées et des frissons ont également été rapportés, mais leur fréquence est plus faible. La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (Griffin et Tauxe, 1991; Sharp *et al.*, 1994). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé

du patient (Su et Brandt, 1995). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée.

3.2. Le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique)

Décrit pour la première fois en 1955 par Gasser, le SHU typique touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient brutalement après une diarrhée prodromique sanglante dans la majorité des cas. Ce n'est qu'en 1983 que Karmali *et al.* établissent la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. Deux à 7 % des patients atteints d'une infection intestinale à *E. coli* O157:H7 développent un SHU. Cette incidence est supérieure chez l'enfant et les personnes âgées : 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin et Tauxe, 1991).

Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Le pronostic rénal est favorable dans environ les 2/3 des cas (Loirat *et al.*, 1992). Il correspond à des lésions de microangiopathie thrombotique glomérulaire ou de nécrose corticale. Il est caractérisé par une triade de symptômes associant une anémie hémolytique avec schizocytose, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë (Fong *et al.*, 1982).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Loirat *et al.*, 1992; Siegler, 1994). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre cette enquête française dans laquelle 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996, sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central. (Decludt *et al.*, 2000).

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. Toutefois, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet de maintenir actuellement un taux de mortalité inférieur à 5%. Si des vomissements, de la diarrhée et des symptômes de colite persistent, une nutrition parentérale est nécessaire. Enfin lorsque l'enfant est anurique, une dialyse est indiquée pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volémique.

3.3. Le PTT (Purpura Thrombotique Thrombocytopenique)

Le purpura thrombotique et thrombocytopenique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschowitz 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 essentiellement l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopenie, une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. La diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993).

La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale. Il s'agit initialement de modifications du comportement avec confusion, délire et troubles de conscience. Les signes d'atteinte focale associent crises d'épilepsie, hémiparésie, aphasie et anomalies du champ visuel. Ces symptômes neurologiques peuvent fluctuer et se terminer en coma. L'atteinte des vaisseaux myocardiques peut être à l'origine de mort subite chez certains malades.

Le traitement s'est progressivement focalisé sur l'utilisation d'exsanguinotransfusions ou de plasmaphères répétées associées à la perfusion de plasma frais congelé. Avec cette approche thérapeutique, la mortalité globale a nettement diminué, l'évolution est favorable dans plus de la moitié des cas.

4. Physiologie des STEC

4.1. Facteurs influençant la multiplication des STEC

En ce qui concerne les STEC, nous disposons actuellement que de très peu d'informations sur les facteurs influençant leur croissance. Il faut savoir que l'essentiel des renseignements fournis par la bibliographie concerne le sérotype O157 :H7.

- **Température**

Le taux de croissance des *E. coli* O157:H7 augmente lorsque la température augmente. La température optimale de ce germe est de 37°C et la température maximale permettant le développement est de 45°C (Doyle et Schoeni, 1984). Gardons en mémoire que le dénombrement des coliformes fécaux exige une incubation à 44°C. A cette température, la croissance de *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 à 40°C (Gonthier *et al.*, 2001 ; Nauta et Dufrenne, 1999), une température minimale de croissance à 6-7°C et une température maximale de croissance à 45.5°C (Gonthier *et al.*, 2001 ; Nauta et Dufrenne, 1999). En ce qui concerne *E. coli* O157:H7 et *E. coli* O26, il a été démontré que la température optimale de croissance en laboratoire était de 41.5°C. Ces données montrent que la température d'enrichissement de 42°C, préconisée par les méthodes normalisées pour le recouvrement d'*E. coli* O157:H7 validé par l'AFNOR se situe au-delà de la température optimale de croissance des STEC en général.

Les conditions de température évoquées ci-dessus correspondent aux conditions de croissance optimum des bactéries en laboratoire. Des études ont été menées pour connaître l'impact de la congélation sur ces bactéries; cependant, peu d'éléments existent sur l'effet de la congélation sur *E. coli* O157:H7 et plus généralement sur les STEC. Il apparaît toutefois que cette bactérie peut survivre à des températures inférieures à -80°C dans des viandes hachées de bœuf. Il a été montré que la destruction cellulaire est très limitée lors d'un stockage pendant 9 mois à une température de -20°C (Doyle et Schoeni, 1984). 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, des éventuelles remontées en température mais aussi de la nature de la matrice alimentaire.

Quelques études se sont plus axées sur la réfrigération, il a été démontré que 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. 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 salades (Abdul Raouf *et al.*, 1993). Bien qu'aucune croissance n'ait été citée pour des températures inférieures à 6.5°C, les STEC peuvent survivre à des températures basses pendant de longues périodes.

- pH

Le pH minimal (obtenu avec de l'acide chlorhydrique) permettant la croissance d'*E. coli* O157:H7 est de 4.5 quand les autres paramètres physico-chimiques sont favorables (Glass *et al.*, 1992). Le pH minimal dépend également du type d'acidité présent. Ainsi l'acide acétique est démontré comme ayant une activité inhibitrice supérieure à l'acide lactique ; tous deux sont plus inhibiteurs que l'acide chlorhydrique selon Davies *et al.* (1992).

Plusieurs études ont également rapporté que *E. coli* O157:H7 pouvait survivre dans les produits carnés fermentés (Riordan *et al.*, 1998 ; Abdul-Raouf *et al.*, 1993 ; Glass *et al.*, 1992), les produits laitiers fermentés (Dineen *et al.*, 1998; Massa *et al.*, 1997), le jus de pomme (Zhao *et al.*, 1993), la mayonnaise (Zhao and Doyle, 1994), les sauces pour salades (Skandamis and Nychas, 2000) et le vinaigre (Tsujiyata *et al.*, 1998). L'analyse des épidémies a permis de pointer le fait que ni l'acidité, ni certain procédé de type fermentation ne permettait d'hygiéniser les aliments contre les STEC. Ainsi plusieurs épidémies sont survenues suite à la consommation de ce type d'aliments, parmi elles : en 2002 en Suède la consommation de saucisses fermentées de boeuf contaminées par *E. coli* O157:H7 (39 cas, 12 SHU) (Sartz *et al.*, 2008) ; en 2007 en Norvège, des saucisses de moutons séchées et fermentées contaminées par *E. coli* O103:H25 (6 SHU) (Schimmer *et al.*, 2008).

Plusieurs mécanismes permettent à *E. coli* d'être résistant à l'acidité. Le gène *rpoS* régule l'expression des gènes mis en œuvre pour la survie de la bactérie en milieu acide et permet une survie de la bactérie à des pH inférieurs à 2.5 pendant plus de 2 heures. Une fois induite, la résistance à l'acidité est stable pendant le stockage au froid. La bactérie en phase stationnaire de croissance est 1000 fois plus résistante à l'acidité qu'en phase exponentielle et n'a pas besoin d'un contact ultérieur avec l'acidité pour maintenir cette résistance. Des mutations du gène *rpoS* peuvent être à l'origine des différences d'intensité de l'acidotolérance (Waterman and Small, 1996).

- Activité de l'eau

Nous disposons actuellement que de très peu d'informations concernant l'effet de l'activité de l'eau sur la croissance des STEC, les études ont essentiellement porté sur des milieux et des produits dont l' a_w était contrôlée par l'ajout de NaCl. L'activité de l'eau minimale pour la croissance d'*E. coli* O157:H7 est de 0.953 (Nauta et Dufrenne, 1999). L' a_w optimum pour la croissance est de 0.995 selon les données de l'ICMSF(1996).

- Autres facteurs

En ce qui concerne les produits désinfectants, Rice *et al.* (1999) n'ont pas observé de différence significative de résistance au chlore de sept souches d'*E. coli* O157:H7 et de quatre *E. coli* non pathogènes. Cette étude a fait suite à des épidémies liées à la consommation d'eau contaminées et a permis de mettre en évidence la sensibilité au chlore des souches testées. En effet, après une minute d'exposition à une quantité de chlore donnée, la quantité de souches viables avait nettement diminué.

Les STEC possèdent une résistance à de nombreux antibiotiques. Ces résistances sont utilisées pour favoriser la croissance des STEC lors de l'étape d'enrichissement nécessaire pour la détection des STEC dans les aliments.

Les conditions de stockage en aérobiose facilitent la croissance d'*E. coli* O157:H7 à l'opposé des conditions en anaérobies. Les différences sont toutefois minimales et la bactérie s'adapte bien aux deux situations (Buchanan et Klavitter, 1992). Le conditionnement en atmosphère modifiée de certains légumes a très peu d'effet sur la croissance et la survie de cette bactérie (Abdulf-Raouf *et al.*, 1993).

Uyttendaele *et al.* (2001) ont étudié le comportement d'*E. coli* O157:H7 inoculé à la surface de steaks de bœuf, conservés suivant trois modalités : sous vide, sous atmosphère modifiée (40% CO₂, 60% N₂) ou sous air. Aucun conditionnement testé ne semble influencer la survie d'*E. coli* O157:H7.

4.2. Différence entre *E. coli* O157:H7 et les STEC

Comme nous l'avons dit précédemment, à ce jour, les données sur la physiologie des STEC concernent essentiellement le seul sérotype O157:H7. Pour les autres sérogroupes (O26, O103, O111, O145...), les données sont quasiment inexistantes.

A l'heure actuelle, aucune caractéristique biochimique commune n'a été identifiée entre les différents STEC. Cependant, il existe des différences entre les *E. coli* O157:H7 et les autres STEC. En effet, la plupart des réactions biochimiques de *E. coli* O157:H7 sont typiques des *E. coli* à l'exception toutefois de la fermentation du sorbitol et de l'activité β -glucuronidase (Lingwood *et al.*, 1987). Environ 93 % des souches de *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures ; à l'inverse *E. coli* O157:H7 ne le fermente pas (Neaves *et al.*, 1994). Il existe toutefois des exceptions, dans différentes études, des souches STEC appartenant au sérotype O157:H7 fermentaient le sorbitol en 24 heures (Morgan *et al.*, 1993; Moxley and Francis, 1986; Wilson *et al.*, 1992). La prévalence de ces STEC est actuellement peu connue. En outre, 93 % des *E. coli* sont β -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne produisent pas de β -glucuronidase (Tesh *et al.*, 1991). Ces caractéristiques biochimiques particulières sont utilisées pour l'isolement d'*E. coli* O157:H7.

5. Epidémiologie humaine

5.1. Epidémiologie descriptive

- Populations sensibles

Les personnes les plus susceptibles de développer la maladie sont : les enfants en bas âge (< 5 ans), les personnes âgées (> 65ans) et les personnes ayant pris récemment un traitement antibiotique (Griffin *et al.*, 1990). Néanmoins, toute personne est potentiellement à risque et peut développer une diarrhée, voire un SHU. En effet, lors de l'épidémie survenue dans le sud de la France en octobre 2005 suite à la consommation de steak hachés contaminés par *E. coli* O157:H7, une personne de 42 ans, sans antécédents pathologiques avérés, a présenté un cas de SHU. Par ailleurs, d'autres personnes peuvent être considérées à risque du fait de leur exposition fréquente à un réservoir animal de STEC, au travers de leurs activités professionnelles (i.e. éleveurs...) ou de leurs loisirs (enfants en classe verte, ferme pédagogique...).

En France, la surveillance des infections à STEC est basée sur celle des SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Elle repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires et est coordonnée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est proche de celle observée dans d'autres pays européens et s'échelonne à moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans.

- Variations saisonnières

En France, depuis la mise en place de la surveillance des SHU en 1996, des cas sporadiques de SHU avec une recrudescence saisonnière pendant la période estivale ont été enregistrés (juin- septembre) (Haeghebaert *et al.*, 2002). Cette augmentation estivale est aussi observée dans d'autres pays européens : Angleterre et Pays de Galles (Bolton *et al.*, 2000), Irlande (Derval, 2001), Écosse (MacDonald *et al.*, 1996), Danemark (Scheutz *et al.*, 2001), Belgique, Pays-bas et Allemagne (Van de Kar *et al.*, 1996), et en Amérique du Nord (Michel *et al.*, 1999).

5.2. Sources et réservoirs

Plusieurs épidémies liées à STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale. La viande de boeuf, le lait et les produits laitiers, les jus de fruits ainsi que les légumes crus font partie des aliments actuellement majoritairement incriminés. Le risque de contamination des denrées d'origine animale est, il est vrai, fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées à la ferme (notamment pendant la traite), en abattoir et dans les ateliers de transformation.

- Produits carnés

De nombreuses épidémies d'infection à *E. coli* O157:H7 ont été associées à la consommation de viande de boeuf ou de préparations à base de viande de boeuf et notamment récemment en France avec l'épidémie survenue dans le sud-ouest en octobre 2005.

Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer le mode de contamination des denrées alimentaires. Les études menées au niveau de la filière viande ont eu pour but de mettre en évidence le lien entre le portage au niveau fécal et la contamination des carcasses puis des viandes et produits à base de viande.

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). D'autre part, une inter-contamination des carcasses sur la chaîne d'abattage peut également se produire via les outils utilisés par les opérateurs. Le processus de dissémination du pathogène se poursuit ensuite au niveau des étapes de transformation des viandes, notamment par exemple lors de la fabrication du haché où les carcasses contaminées désossées et découpées (minerais) peuvent ensuite après broyage contaminer un ou plusieurs lots de steaks hachés.

Les tableaux 2 et 3 présentent respectivement, pour différents pays, quelques fréquences observées de produits contaminés (viande de boeuf cru et steak haché) par des STEC et *E. coli* O157:H7.

Tableau 2 : Fréquences observées de produits contaminés par des STEC.

	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Référence
STEC	Suède	Minerai et découpe	543	1,1	Lindqvist <i>et al.</i> , 1998
	France	Bœuf cru	411	3,9	Pradel <i>et al.</i> , 2000
	Suisse	Bœuf haché	211	2,4	Fantelli et Stephan, 2001
	Etats-Unis	Minerai	487	5,7	Bosilevac <i>et al.</i> , 2007
	Espagne	Bœuf haché	785	12,5	Mora <i>et al.</i> , 2007

* nombre de produits testés

Tableau 3 : Fréquences observées de produits contaminées par *E. coli* O157 :H7.

<i>E. coli</i> O157 :H7	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Référence
	Royaume- Uni	Bœuf cru	3216	1,1	Chapman <i>et al.</i> , 2000
	Argentine	Bœuf haché	160	3,8	Chinen <i>et al.</i> , 2001
	Suisse	Bœuf haché	211	2,3	Fantelli et Stephan, 2001
	France	Bœuf haché	3500	0,1	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2002
	Etats-Unis	Bœuf haché	296	16,8	Samadpour <i>et al.</i> , 2002
	Irlande	Bœuf haché	1533	2,8	Cagney <i>et al.</i> , 2004
	Irlande	Minerai	1351	0,07 à 1,85	Carnet <i>et al.</i> , 2006
	Serbie	Bœuf haché	48	6,2	Nastijevic <i>et al.</i> , 2009
Saucisse de boeuf		48	2,1		

* nombre de produits testés

Il est également fait état de la fréquence observée de carcasses de bovins contaminées en surface par *E. coli* O157:H7, ainsi que du niveau de contamination de ces carcasses par le pathogène (Tableau 4).

Tableau 4 : Fréquences de carcasses de bovins contaminées par *E. coli* O157 :H7 et niveaux de contamination (Vimont, 2007).

Etat des carcasses	Méthode d'échantillonnage	n _{total}	Fréquence (%)	Niveaux moyens de contamination (UFC/100cm ²)	Pays	Référence
Av. Ev.	Chiffonnage (100cm ²)	576	14,7	<1,5	US	Arthur et al., 2004
Ap. Tr.			0,3	<1,5		
Av. Ev.	Chiffonnage	1232	27	17*	US	Barkocy et al., 2003
Ap. Tr.			1	<1		
Av. Ev.	Chiffonnage (8000 cm ²)	149	23	ND [†]	US	Bosilevac et al., 2004
Av. Ev.	Chiffonnage (8000 cm ²)	240	50	ND	US	Nou et al., 2003
-	Excision (100 cm ²)	1500	1,4	ND	UK	Chapman et al., 2001
Ap. Saig.	Chiffonnage (400cm ²)	100	12	ND	Italie	Bonardi et al., 2001
Av. Réf.	Excision (4 x 5cm ²)	132	4	7,5 UFC.g ⁻¹	Irlande du nord	Carney et al., 2006
Av. Réf.	Chiffonnage (300cm ²)	100	6	<10	Australie	Fegan et al., 2005
Ap. Réf.			0	ND		
Ap. Réf.	Chiffonnage (300cm ²)	670	0,1	ND	Australie	Phillips et al., 2001
Av. Réf.	Chiffonnage	330	3,6	ND	Turquie	Gun et al., 2003
Av. Réf.	Excision (225cm ²)	255	0,4	ND	France	Guyon et al., 2001

* avec une médiane de 1,1 UFC/100 cm²

† Non Déterminé

Av. Ev., Avant Éviscération; Ap. Tr., Après Traitement des carcasses; Ap. Saig., Après Saignée de l'animal; Av. Réf., Avant Réfrigération ; Ap. Réf., Après réfrigération.

- Produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis plusieurs années. Toutefois, ces épidémies n'ont concerné que les fromages ou lait fermenté uniquement à base de lait cru ou de lait insuffisamment chauffé. La France a déploré 2 épidémies associées à des fromages au lait cru : en 2004 après la consommation de fromage frais au lait cru de chèvre contaminé par *E. coli* O157 :H7 (Espié *et al.*, 2006a) et en 2005 après la consommation de Camembert au lait cru contaminé par *E. coli* O26 (Espié *et al.*, 2006b).

La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait par les STEC. Néanmoins, une étude menée *in vitro* a montré l'envahissement des

cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157:H7 (Matthews *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une source mammaire de contamination du lait.

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou des autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles, étant donné la difficulté (due au facteur de dilution) de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange. Le Tableau 5 fait état de quelques fréquences observées en Europe, de laits et produits laitiers contaminés par des STEC.

Tableau 5 : Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC (Vimont, 2007).

	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Méthode utilisée	Référence
STEC	France	Lait cru	205	21,5	PCR-ELISA	Fach et al., 2001
		Fromages au lait cru	180	30,5		
		Fromages au lait pasteurisé	45	8,9		
	France	Fromages au lait cru	1039	13	PCR	Vernozy-Rozand et al., 2002
	Allemagne	Lait cru et lait certifié	273	3,9 et 2,1	VT-ELISA	Klie et al., 1997
	Hollande	Lait cru	1011	0	IMS	Heuvelink et al., 1998
	Angleterre	Lait cru	500	0	IMS	Coia et al., 2001
Fromages au lait cru		739	0			
Italie	Lait cru	100	0	EHEC-ELISA test	Massa et al., 1999	

*Nombre de produits testés

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 dans le lait, une étude américaine a montré que, sur 268 prélèvements de lait cru effectués, seuls 2 échantillons (0,75%) se sont avérés contaminés par *E. coli* O157:H7 (Murinda *et al.*, 2002). En outre en Europe, une étude Anglaise (Mechie *et al.*, 1997) a révélé que, sur 329 prélèvements de lait issu du tank, aucun ne présentait une sérologie positive pour *E. coli* O157:H7. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les prélèvements ont été réalisés sur des laits de mélange et que par conséquent les laits étant faiblement contaminés à la base, l'effet dilution prend alors tout son sens. Il est plus fréquent de détecter les *E. coli* dans les fromages dans la mesure où certaines technologies de fabrication entraînent leur multiplication.

- Les végétaux

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination de l'homme par les STEC et en particulier par *E. coli* O157:H7. Différents végétaux ont été mis en cause comme, par exemple, de la laitue (Ackers *et al.*, 1998; Hilborn *et al.*, 1999), des pommes de terre (Morgan *et al.*, 1988) ou encore des pousses de radis blanc (Taormina *et al.*, 1999). Les causes de contamination des cultures maraîchères mises en avant sont, le plus souvent, l'irrigation de ces cultures par de l'eau elle-même contaminée et l'épandage d'effluents d'élevage contaminés par les STEC.

Aux Etats-Unis, une épidémie liée à la consommation d'épinards contaminés par *E. coli* O157:H7 a causé tout récemment la mort de trois personnes. Il convient de noter que sur les 199 personnes infectées, 141 (71%) étaient des femmes et 22 (11%) des enfants de moins de 5 ans. Le pourcentage, élevé, recensé pour les femmes est probablement dû à leurs habitudes de consommation.

Enfin toujours aux Etats-Unis, du cidre non pasteurisé a également été la cause de plusieurs épidémies (Besser *et al.*, 1993 ; Cody *et al.*, 1999), et, une fois encore, l'origine suspectée est une contamination fécale par des bovins.

Un état des lieux de la prévalence des STEC et du sérotype O157:H7 dans la filière « fruits et légumes » ne sera pas établi dans cette partie, étant donné le faible nombre de données disponibles dans la littérature.

A noter que les différences de prévalence de *E. coli* O157:H7 et des STEC qui existent entre les pays sont certes dues au lieu même de l'investigation, mais peuvent également être liées aux méthodes d'échantillonnage et de détection.

5.3. Les modes de transmission

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. La Figure 5 présente les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme. 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 interhumaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

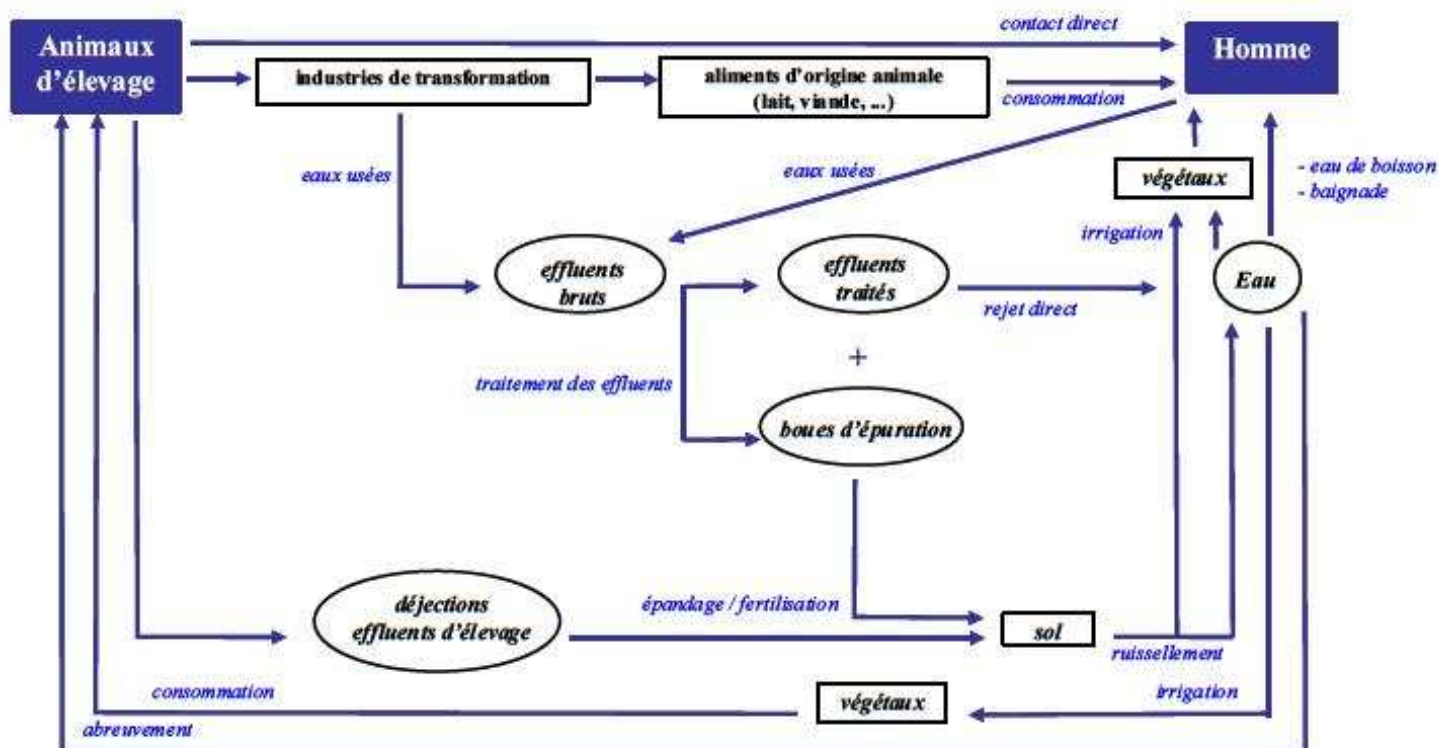


Figure 5 : Flux potentiels de STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003).

- 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 (Martin *et al.*, 1994 ; Orskov *et al.*, 1987 ; Griffin et Tauxe, 1991 ; Doyle, 1991 ; Paton *et al.*, 1996). De même, des produits végétaux contaminés et des produits laitiers ont été à l'origine d'épidémies (Morgan *et al.*, 1993 ; Cieslak *et al.*, 1993 ; Ackers *et al.*, 1998 ; Miller et Kaspar, 1994).

Pour certains aliments, l'hypothèse d'une contamination croisée avec de la viande de bœuf 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 (Barwick *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002b; Blackburn *et al.*, 2004; Yoder *et al.*, 2004; Dziuban *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006) contre 3% au Royaume-Uni (Smith *et al.*, 2006).

□ 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 (Holme, 2003; 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 (Keene *et al.*, 1994; CDC, 1996; Cransberg *et al.*, 1996; Ackman *et al.*, 1997; Paunio *et al.*, 1999) ou dans une piscine (Brewster *et al.*, 1994; Hildebrand *et al.*, 1996; 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

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Griffin, 1995; Stephan et Untermann, 1999). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades.

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 (Belongia *et al.*, 1993; Allaby et Mayon-White, 1995; Boudailliez *et al.*, 1997; Swerdlow et Griffin, 1997; Al-Jader *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.*, 2005), les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) et dans les centres psychiatriques

(Pavia *et al.*, 1990). 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). 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 (Renwick *et al.*, 1994; Coia, 1998; Kassenborgh *et al.*, 1998; Parry et Salmon, 1998; Trevena *et al.*, 1999; Beutin *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2001a) mais aussi lors d'épidémies (Shukla *et al.*, 1994; Louie *et al.*, 1999; Milne *et al.*, 1999; 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).

6. Principales épidémies

Tableau 6 : Les principales épidémies à STEC

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nb de SHU + nb de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Référence
1982	Oregon-Michigan USA	O157:H7	46	sandwich avec viande de bœuf hachée	Riley et al., 1983
1984	Nebraska USA	O157:H7	34 (4décès)	hamburger	Ryan et al., 1986
1991	Canada	O157:H7	152 (22 SHU et 2 décès)	viande de caribou et bœuf haché	Orr et al., 1994
1992-93	Washington USA	O157:H7	501 (45 SHU et 3 décès)	hamburger	Bell et al., 1994
1994	Washington-Californie USA	O157:H7	23 (2 SHU)	salami sec	Tilden et al., 1996
1995	Australie	O111:H-	23 SHU (1décès)	saucisse sèche fermentée	Paton et al., 1996
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	plats préparés à base de viande crue (bœuf et porc)	Stevenson et Hanson, 1996
1996	Ecosse	O157:H7	512 (34 SHU et 17 décès)	viande de bœuf	Cowden et al., 2001
2000	Espagne	O157:H7	181 (6 SHU)	saucisse	Martinez et al., 2001
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	viande de mouton	Espié et Vaillant, 2003
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	viande de bœuf	Mailles et al., 2006
2006	Norvège	O103:H25	17 (10 SHU et 1 décès)	saucisse fermentée	Sekse et al., 2009
2010	USA	O26	3	viande de bœuf	non publié
1994	Angleterre	O157:H7	70 (9 SHU et 1 PTT)	lait pasteurisé de production locale	Upton et Coia, 1994
1997	Ecosse	O157:H-	37	gâteau à la crème	O'Brien et al., 2001
1998	Wisconsin USA	O157:H7	55	fromage frais caillé	CDC, 2000
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	lait non pasteurisé	CDSC, 2000
2001	Colombie Britannique Canada	O157:H7	5 (2 SHU)	lait de chèvre non pasteurisé	McIntyre et al., 2002
2005	France	O26	6 SHU	camembert	Espié et al., 2006
1995	Montana USA	O157:H7	>70 (1 SHU)	laitue	Ackers et al., 1998
1996	Japon	O157:H7	9451 (12 décès)	radis blanc	Michino et al., 1999
1997	Michigan-Virginie USA	O157:H7	108 (4 SHU)	germe de luzerne	Breuer et al., 2001
1996	Canada	O157:H7	70 (14 SHU et 1 décès)	jus de pomme non pasteurisé	Cody et al., 1999
1996	Connecticut USA	O157:H7	14 (3 SHU)	jus de pomme frais non pasteurisé	Hilborn et al., 2000
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU et 3 décès)	épinards	CDC, 2006
2010	USA	O145	19	laitue	CDC, 2010

Pendant les années 80, la plupart des infections à EHEC étaient essentiellement associées à la consommation de denrées d'origine animale (tableau 6). L'épidémiologie des infections à EHEC a considérablement changé depuis ces dix dernières années, et l'ingestion de végétaux ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine. Ceci s'explique sans doute par (i) une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination lors d'une épidémie à EHEC, (ii) une multiplication des élevages bovins intensifs, (iii) et par une modification du régime alimentaire chez l'homme, avec une consommation accrue de fruits et légumes crus dans les pays développés. En Ecosse, entre 1994 et 2003, sur 35 épidémies à *E. coli* O157:H7 identifiées, 19 (54%) étaient associées à des sources environnementales de contamination (Strachan *et al.*, 2006). De même aux Etats-Unis, 48% des épidémies survenues entre 1982 et 2002 n'étaient pas d'origine alimentaire, avec une nette augmentation des épidémies d'origine environnementale après 1995 (Rangel *et al.*, 2005).

Les EHEC constituent la cause majeure de diarrhée hémorragique et de SHU dans les pays à climat tempéré (Caprioli et Tozzi, 1998; Griffin, 1998; Smith *et al.*, 1998). En France, le taux d'incidence du SHU est d'environ 0,7 pour 100 000 enfants âgés de moins de 15 ans (soit 76 cas notifiés) et de 2,1 pour 100 000 enfants âgés de moins de 2 ans (Haeghebaert *et al.*, 2003). Le sérotype le plus fréquemment mis en cause lors d'épidémies est O157:H7 (Bitzan *et al.*, 1993; Siegler, 1995; Meyer-Broseta *et al.*, 2001). Les Etats-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les pays où la fréquence d'isolement du sérotype O157:H7 est la plus importante. Ce sérotype a toutefois été décrit dans de multiples épidémies survenues dans différents pays européens, dont la France, et également en Australie, Argentine, Afrique du sud, Thaïlande, Israël, Chine et Japon (Lopez *et al.*, 1989; Griffin et Tauxe, 1991; Lerman *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1996; Soderstrom *et al.*, 2005; Doorduyn *et al.*, 2006; Espie *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2006). En France, il est impliqué dans 86% des cas de SHU (Haeghebaert *et al.*, 2003). Toutefois, les sérotypes autres que O157:H7 ont très certainement été sous-estimés. La communauté scientifique met régulièrement en évidence des STEC non-O157:H7 chez les malades atteints de SHU ou de colite hémorragique avec en ordre décroissant de fréquence les sérotypes O111:H- et O111:H2, O26:H11 et O26:H-, et O103:H2 et O103:H-. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive et n'indique que les sérotypes majeurs isolés chez les malades. Ainsi d'autres sérogroupes peuvent être impliqués tels que O55, O82, O105, O113, O145, O171, etc (Caprioli *et al.*, 1994; Tarr, 1995; Paton *et al.*, 1996; Gerber *et al.*, 2002), mais leur fréquence réelle est difficile à estimer du fait de méthodes de détection souvent inadaptées ou d'absence de recherche (Griffin *et al.*, 2000).

CHAPITRE 2 : Recherche de *E. coli* O157 :H7 et des STEC dans les aliments

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales. *E. coli* fait partie de la microflore bactérienne du tractus digestif de l'homme ainsi que de la plupart des animaux à sang chaud. Même si la majorité des souches sont commensales banales, quelques unes sont à l'origine de pathologies extra intestinales ou intestinales. En 1982, aux Etats-Unis, deux épidémies de colite hémorragique sévère, nécessitant une hospitalisation de 70% des malades, apparurent après la consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide. Les analyses mises en œuvre sur les selles des patients et sur la viande hachée ayant servi à la confection des hamburgers mirent en évidence une souche d'*Escherichia coli* d'un sérotype particulier, O157 :H7. Peu de temps après, une étude menée sur des selles d'enfants atteints par un syndrome hémolytique et urémique (SHU) montra la présence d'une toxine, cytotoxique pour les cultures cellulaires Véro, d'où son nom de "vérotoxine". *E. coli* O157 :H7 est le principal sérotype d'*E. coli* produisant un grande quantité de vérotoxines. Il est donc identifié comme le chef de file d'un groupe d'*E. coli* appelé vérotoxino-gènes, VTEC (*verotoxinogenic Escherichia coli*) ou STEC (*Shiga Toxine producing Escherichia coli*). Depuis 1982, de nombreux autres cas d'infections humaines consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des VTEC ont été rapportés à travers le monde.

L'actualité place régulièrement au devant de la scène des problèmes liés à la sécurité alimentaire. Dans le but de minimiser les risques d'infection des consommateurs, de nombreux contrôles microbiologiques sont imposés tout au long de la chaîne de fabrication des denrées alimentaires. A ce jour, il n'existe pas de critères microbiologiques concernant les STEC. Cependant, l'avis de l'AFSSA recommande de rechercher dans des aliments à risque certains STEC définis comme pathogènes.

En ce qui concerne la détection des STEC, la seule norme existante est spécifique à la détection de *E. coli* O157 :H7. En effet, la norme ISO EN-16654 détaille une méthode destinée à rechercher des *Escherichia coli* séro-groupe O157 dans les aliments. C'est pourquoi il existe un grand nombre de méthodes validées AFNOR commercialisées permettant la détection de ce séro-groupe. En revanche, aucune méthode permettant la détection des *E. coli*

non-O157 n'est validée à ce jour. L'avis de l'AFSSA de juillet 2008, donne pourtant une définition précise des souches STEC pathogènes, et parmi elles des sérogroupes autres que O157. Pourtant, aucune information n'est préconisée pour la détection de ces STEC dans les aliments. Les méthodes appliquées dans ce cas par certains laboratoires de recherche reposent donc sur des publications scientifiques récentes.

De manière générale, en microbiologie alimentaire, le protocole classique de recherche des STEC et plus spécifiquement de *E. coli* O157:H7 dans les aliments suit toujours le même schéma (figure 6).

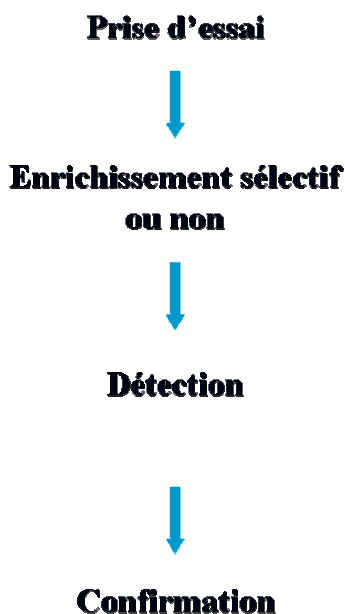


Figure 6 : Protocole simplifié de recherche des STEC

Tout d'abord, l'échantillonnage ou prise d'essai (en général de 25g) est réalisé. Sa nature est fonction de l'aliment à analyser. Ensuite, il y a l'étape d'enrichissement (sélectif ou non), réalisée dans un bouillon nutritif qui permet à la bactérie recherchée de se multiplier avant l'étape de détection qui peut être aussi bien immunologique que génétique. Cette étape de détection permet l'obtention d'un résultat positif (une suspicion) ou négatif (arrêt des analyses). En cas de résultat positif, la présence de la bactérie cible est suspectée et une étape supplémentaire s'ajoute donc au protocole : l'étape de confirmation. Cette dernière permet de confirmer la présence de la bactérie suspectée dans l'aliment en déterminant son genre, son espèce et les facteurs de virulence qu'elle porte. Cette étape de confirmation est donc en quelque sorte la plus importante du protocole puisque c'est elle qui détermine la dangerosité

de la souche présente et donc le risque encouru en cas de consommation de l'aliment dans lequel elle est présente.

Les différentes étapes du protocole de détection de *E. coli* O157:H7 étant très bien documentées, nous les détaillerons ci-dessous. Lorsque des données complémentaires sur les autres STEC seront à notre disposition, elles seront également mentionnées.

1. Les matrices alimentaires

Le réservoir des STEC est constitué par des animaux porteurs sains, et plus particulièrement le tube digestif des ruminants (essentiellement les bovins). La contamination des aliments est la plupart du temps liée à une contamination fécale. Elle peut avoir lieu à l'abattoir lorsque l'hygiène de l'abattage n'est pas maîtrisée (notamment lors des étapes de dépouillement, d'élimination du cuir et de l'éviscération). Elle peut également être liée à une mauvaise hygiène de la traite. Enfin, les végétaux peuvent être contaminés par des effluents tels que les substances d'épandages ou de l'eau contaminée par des déjections animales.

Ainsi, les études épidémiologiques ont montré que les aliments le plus souvent impliqués dans les épidémies à STEC étaient la viande de bœuf insuffisamment cuite et les fromages au lait cru. A titre d'exemple, en France, en octobre 2005, une épidémie liée à de la viande de bœuf contaminée par *E. coli* O157:H7 (Mailles *et al.*, 2006) a été décrite. Peu de temps après, une autre épidémie liée à la consommation de camembert au lait cru contaminé par des *E. coli* O26 (Espie *et al.*, 2006) a été répertoriée.

Nous nous sommes donc attachés à optimiser la détection des STEC, particulièrement dans ces deux types de matrices

1.1. Les produits laitiers

En France la production de fromage au lait cru représentait en 2005 15% de la production totale. Les produits laitiers à base de lait cru sont considérés comme des produits à risque. En effet, le lait nécessaire à la fabrication peut être contaminé lors de la traite. Sans étape de destruction des bactéries comme une pasteurisation, ces bactéries peuvent se développer dans le lait. Ainsi, lors de l'étape de coagulation du lait par l'action de la présure et ou des bactéries lactiques, la température ambiante avoisine les 37°C. A cette température, un grand nombre de bactéries se développent y compris les bactéries pathogènes (Maher *et al.*, 2001 ; D'Amico *et al.*, 2010). Cependant même après une étape de décontamination, le risque de contamination du lait est toujours possible lors de la fabrication du fromage par exemple. Cette contamination est problématique, car après stérilisation, il y a une destruction totale des

bactéries. En l'absence de flore annexe, les bactéries pathogènes n'ont plus de compétitions bactériennes et peuvent se développer plus facilement.

Lorsque la température de chauffage du processus de fabrication ne dépasse pas 55°C, le lait est dit « cru ». Dans cette étude, il a été décidé de travailler sur des fromages au lait cru français pour trois raisons majeures :

- Dans ce type de matrice, une grande diversité bactérienne est présente. Il existe donc des phénomènes de compétition bactérienne. Ainsi, la présence de cette microflore annexe, rend plus difficile la recherche de bactérie pathogène comme *E. coli* O26.
- Lors de l'épidémie à *E. coli* O26, en France, en 2005, l'aliment incriminé était du fromage au lait cru.
- De plus, le plan de surveillance réalisée au sein du laboratoire, au cours de l'année 2009, a montré la présence de souches de STEC (surtout O26) dans les produits à base de lait cru.

Les fromages sont connus pour être des matrices où les STEC sont difficiles à détecter à cause de différents paramètres comme la teneur en matières grasses, la présence ou non de croûte... Un grand nombre de technologies a été évalué, afin de voir si le procédé de fabrication pouvait avoir un impact sur le développement des bactéries recherchées. En effet, la technologie fromagère peut avoir une influence sur différents paramètres comme : la composition du lait (taux de protéine, de matière grasse...), et les facteurs physico-chimiques (pH, aw...) qui varient considérablement d'une technologie à l'autre. Par exemple, pour les fromages à pâte pressée l'aw sera comprise entre 0.95 et 0.91 alors que pour les fromages à pâte molle elle sera comprise entre 0.96 et 0.99. La variation de l'ensemble de ces paramètres est susceptible d'influencer la croissance d'*E. coli* O26 lors de l'enrichissement.

1.2. La viande de bœuf

La viande hachée de bœuf est la matrice la plus souvent incriminée lors des épidémies à *E. coli* O157:H7.

Elle est fabriquée à partir des muscles et de gras. Les blocs de viande de bœuf utilisés lors de la fabrication de viande hachée sont aussi appelés minerai. En fonction de la quantité de matières grasses ajoutée les industriels fabriquent de la viande hachée à 5, 10, 15 ou 20 % de matière grasse. Il existe aussi des préparations à base de viande hachée. Il s'agit de

préparation contenant au moins 50% de viande et complétée avec des ingrédients d'origine végétales (tomates, oignons...).

Différents types de conditionnement de la viande sont utilisés parmi lesquels: le sous vide, le conditionnement sous atmosphère modifiée mais aussi la congélation. Ces modes de conservation ont pour but la prolongation de la durée de vie du produit mais aussi l'assurance d'une meilleure qualité hygiénique du produit consommé. Par exemple, les conditionnements sous-vide ou sous-atmosphère modifiée limitent la croissance des bactéries aérobies. Il a été montré que la flore annexe de la viande était en grande partie composée de bactéries lactiques (Vold *et al.*, 2000) qui lors d'une mise sous vide entraînent une acidification et ainsi limitent la croissance des autres bactéries présentes.

2. L'échantillonnage

L'échantillonnage constitue la première étape importante du protocole de recherche du pathogène. En effet, le résultat final obtenu et les mesures correctives éventuellement adoptées en conséquence sont directement liés et tributaires du type et de la taille de l'échantillon.

Dans les infections à STEC, les produits carnés font partie des aliments majoritairement incriminés suivis de près par les produits laitiers. Toutefois, nous présenterons ici que les méthodes d'échantillonnage réalisées au sein de la filière viande dans le cadre des systèmes de contrôle de la qualité car elle est moins documentée pour les produits laitiers. La présence des STEC dans les produits carnés, tel le steak haché, est fréquemment liée à une contamination initiale des carcasses de bovins au niveau de l'abattoir. Si toutefois la contamination en STEC ne vient pas de l'abattoir, elle peut provenir des industries de transformation. Nous nous intéresserons principalement aux méthodes de prélèvement utilisées pour l'échantillonnage au niveau des industries de transformation.

Afin d'éviter la présence de STEC dans leur produits finis, les industriels de l'agroalimentaire peuvent (dans le cas où l'abattoir n'est pas couplé à l'usine de transformation) réaliser des prélèvements de surface (éponges, excisions...) sur les quartiers avants ou demi carcasses (à réception) destinés à la fabrication de steak haché. Qui plus est, des prélèvements complémentaires peuvent être effectués sur les minerais, juste avant le hachage final. Enfin, d'ultimes analyses sont évidemment réalisées sur les produits finis avant leur mise sur le marché. A noter que des prélèvements environnementaux de surface sont également réalisés dans les ateliers de transformation, à l'image de ceux qui sont réalisés au niveau de l'abattoir.

Dans notre étude, nous nous sommes plus spécifiquement attachés à mettre en œuvre des méthodes de détection sur les produits intermédiaires (minerais) et les produits finis (steaks hachés, fromages...).

Minerais (trimming en anglais)

Ce type de prélèvement est peu commun en France, mais est pratique courante aux Etats-Unis pour la recherche de *E. coli* O157:H7. Néanmoins, il n'existe aucun protocole américain standardisé pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les minerais et les divers protocoles en vigueur dans les industries varient en fonction du nombre de combo bins testés (i.e. conteneurs où sont stockés les minerais avant le hachage), du type d'échantillon (tissus excisés, prélèvements par chiffonnage ou carottage dans le cas de minerais congelés), de la masse de viande collectée ou encore du nombre d'échantillons poolés en un échantillon composite...etc. Les prélèvements de minerais par excision ou chiffonnage sont réalisés sur le dessus des combos car ces derniers sont remplis extrêmement rapidement et en continu. Ainsi, le prélèvement de minerais équivaut à prendre un échantillon toutes les **P** périodes de temps (la période (**P**) étant égale au temps nécessaire pour remplir un combo à partir des minerais découpés sur les lignes).

Quelques protocoles utilisés dans les industries de transformation aux Etats-Unis (McNamara, 2003) sont relatés ci-dessous. La technique de prélèvement utilisée dans ces protocoles est l'excision et la notion de « lot » est définie comme la totalité du chargement en minerais (20 combos, soit 18 tonnes) d'un camion.

Certains protocoles consistent à prendre 75g de tissus excisés à partir de chacun des 20 combos et à rassembler les 20 échantillons de 75g dans un échantillon composite unique et homogène de 1500g. A partir de cet échantillon composite, cinq échantillons de 75g sont ensuite collectés et rassemblés en un seul échantillon composite de 375g, destiné à la recherche de *E. coli* O157:H7 au laboratoire.

D'autres méthodes plus fines consistent à subdiviser le lot de 20 combos en 4 groupes de 5 combos et à prélever 75g de minerais à partir de chacun des 5 combos constituant un groupe. Les 5 échantillons de 75g sont ensuite regroupés dans un échantillon composite de 375g pour la recherche de *E. coli* O157:H7. Un lot est ensuite accepté si aucun des 4 échantillons composites de 375 g (collectés respectivement à partir des 4 groupes de 5 combos) n'est détecté positif.

Des études sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de ces différents protocoles utilisés dans les industries américaines, mais les dernières recommandations de l'ICMSF

(International Commission on Microbial Specifications for Foods) conseillent le prélèvement et l'analyse d'au moins 750g de minerais dans la totalité du chargement d'un camion (soit l'équivalent de 18 tonnes) pour la recherche de *E. coli* O157:H7.

Steak Haché

La prévalence de *E. coli* O157:H7 et des autres STEC a sensiblement augmenté ces dernières années dans les produits carnés, notamment en France. Un grand nombre d'industriels français, à l'instar de leurs homologues américains, font à présent systématiquement la recherche de *E. coli* O157:H7 dans leurs produits. Il n'existe toutefois à l'heure actuelle, en France comme aux Etats-Unis et dans d'autres pays européens, aucun protocole standardisé pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans le steak haché. En effet, à l'image de ce qui a été évoqué précédemment pour la recherche des STEC dans les minerais, différents protocoles sont mis en place dans les industries, et varient principalement en fonction du nombre (fréquence d'échantillonnage) de prises d'essai effectuées et de la masse de chacune de ces prises d'essai.

Il y a donc une nécessité aujourd'hui, notamment en France, d'évaluer et de comparer différents protocoles d'échantillonnage et de détection afin d'améliorer la recherche de *E. coli* O157:H7 et des autres STEC dans le steak haché, tout en tenant compte des contraintes industrielles. Après avoir développé le calcul, à partir de la loi de *Poisson*, de la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 (ou des STEC) en fonction de la prise d'essai réalisée, nous présenterons quelques protocoles d'échantillonnage effectués aux US.

Le tableau ci-dessous (Tableau 7) indique la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir en fonction de la masse de la prise d'essai réalisée et du niveau de contamination du hachoir. Ces probabilités ont été calculées selon *la distribution de Poisson*, supposant une contamination homogène de la totalité de la mûlée présente dans le hachoir. Cette hypothèse paraît recevable compte tenu des temps de pré-hachage et hachage opérés (Reinders *et al.*, 2003 ; Toft *et al.*, 2006) :

$$P = 1 - e^{-C \cdot M}$$

avec *P*, la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 ; *C*, le niveau de contamination de la mûlée

(UFC.g⁻¹) ; *M*, la masse de steak haché (taille de l'échantillon) prélevée (g).

D'après *la distribution de Poisson*, la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir contaminé à une concentration moyenne de 0,04 UFC.g⁻¹ (1 UFC/25g), est égale à 63% lorsque la prise d'essai est de 25g. Pour ce même niveau de contamination, cette probabilité

augmente à hauteur de 95% avec une prise d'essai de 75g. Le même raisonnement peut également être adopté pour les échantillons de lait puisque la contamination dans ce type d'échantillon semble encore plus homogène.

Tableau 7 : Probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir en fonction de la prise d'essai réalisée.

Niveau de contamination de la m \acute{e} lée (UFC <i>E. coli</i> O157:H7.g-1)	Probabilité de détection d' <i>E. coli</i> O157:H7 selon la prise d'essai réalisée (%)				
	25g	75g	125g	375g	750g
4.10-3 (0,1 UFC/25g)	10	26	39	78	95
0,04 (1 UFC/25g)	63	95	99	99,99	100
0,1	92	99,9	9,99	100	100
1	100	100	100	100	100

Aux Etats-Unis, plusieurs industriels ont adopté la méthode « Jack-In-The-Box » (suite à l'épidémie survenue après la consommation de hamburgers contaminés par *E. coli* O157:H7 provenant des restaurants du même nom) pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les m \acute{e} lées de haché. Cette méthode consiste à collecter un steak haché en bout de ligne de fabrication (aux US, « a patty », soit environ 114g) toutes les 15 minutes lors d'une journée de production. Chaque heure les 4 steaks hachés sont regroupés dans un échantillon unique et homogène d'environ 450g, sur lequel seulement 25g de haché seront testés pour la détection de *E. coli* O157:H7.

Un autre protocole réalisé dans les industries américaines a pour but de prélever à la sortie d'un hachoir de 1,4 tonnes (correspondant un lot) trois échantillons de 25g de haché (au début, au milieu et à la fin du lot) rassemblés ensuite en un échantillon unique et homogène de 75g. Quatre échantillons de 75g sont ensuite regroupés dans un échantillon composite homogène de 300g (représentant 5,5 tonnes de viande) et 75g de cet échantillon composite sont ensuite prélevés pour la recherche de *E. coli* O157:H7.

En France, un nombre très variable (d'un industriel à un autre) de prises d'essai de 25g par m \acute{e} lée ou lot de steaks hachés est effectué. Ces prises d'essai peuvent être analysées individuellement ou regroupées pour former des échantillons composites sur lesquels seront réalisées les analyses. Peu de connaissances sont, à l'heure actuelle, disponibles en France sur la question du pooling des échantillons et de la quantité de haché à collecter par m \acute{e} lée afin de

s'assurer de l'absence du pathogène *E. coli* O157:H7 dans les lots de steaks hachés distribués sur le marché.

Au regard de ces interrogations multiples sur la question du prélèvement d'échantillons, l'AFSSA a par ailleurs été récemment saisie par la DGAL pour une demande d'appui scientifique et technique relative aux modalités d'échantillonnage à mettre en oeuvre dans la filière de production des viandes hachées.

3. L'enrichissement des matrices alimentaire

3.1. Généralités

L'enrichissement est la deuxième étape du protocole de recherche des STEC. C'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 taux de bactéries pathogènes retrouvés dans les échantillons environnementaux ou alimentaires (Shinagawa, 1997). L'étape d'enrichissement consiste à prélever une quantité donnée d'échantillon auquel 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 d'incubation varie en fonction de la bactérie recherchée alors que le temps d'incubation dépend en partie de la méthode utilisée. L'objectif de l'étape d'enrichissement est de permettre la croissance des STEC dans un échantillon de produit jusqu'à un seuil permettant sa détection, tout en limitant au maximum le développement de la microflore annexe. La faible quantité et le faible ratio des STEC par rapport aux autres bactéries dans les produits alimentaires exigent par conséquent une phase d'enrichissement optimale de manière à éviter les faux résultats négatifs.

3.2. Le volume du bouillon d'enrichissement

La majorité des données disponibles actuellement concernent *E. coli* O157:H7. Lors de l'étape d'enrichissement, la quantité de prise d'essai ainsi que le volume d'enrichissement utilisé peuvent varier. Le ratio prise d'essai/volume le plus couramment utilisée est le même que celui préconisée par la norme ISO EN-16654, c'est-à-dire une dilution au 1/10 soit 25g de matrice alimentaire dans 225ml d'EPT. Une pratique récente venant des Etats-Unis consiste à réaliser un « pooling » d'échantillons. Cette technique permet d'augmenter la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans leurs produits grâce à une prise d'essai plus importante par lot. La masse de l'échantillon « poolé » peut s'échelonner de 75 à 375g.

Néanmoins, quelques études ont mis en évidence les limites du « pooling » d'échantillons. Une étude américaine (McNamara *et al.*, 2005) a évalué l'influence du « pooling » d'échantillons sur la détection de *E. coli* O157:H7 par différentes méthodes de screening. Trois échantillons composites (75, 125 et 375g) ont alors été testés par ces différentes méthodes après 8, 12 et 16h d'enrichissement. Il a été montré que l'augmentation de la masse de steak haché ou de minerais analysés avait pour conséquence une diminution de la sensibilité de détection des méthodes. Une incubation plus longue semble palier le manque de sensibilité des méthodes testées mais une masse d'échantillon trop importante de haché ou minerais pourrait toutefois engendrer l'obtention de faux résultats négatifs. Le « pooling » d'échantillon entraîne une dilution de la quantité de bactéries cibles recherchées mais aussi une augmentation de la flore annexe. Lors de la réalisation de « pooling » d'échantillon, le volume de milieu ajouté aux différentes prises d'essai est ajusté afin de conserver un ratio « masse d'échantillon/volume de milieu » égal à 1:10 (i.e., 75g:675ml ; 125g:1125ml ; 375g:3375ml). Une récente étude américaine a néanmoins montré (Guerini *et al.*, 2006) que l'utilisation d'un ratio 1:3 donnait des résultats semblables à ceux obtenus avec un ratio de 1:10 et permettait ainsi de réduire le coût lié aux importants volumes de milieux utilisés, notamment dans le cas d'échantillons composites.

3.3. Les différents milieux utilisés

A l'heure actuelle trois milieux d'enrichissement sont plus largement utilisés pour la détection des *E. coli* O157:H7 : le Trypticase Soya Broth modified (mTSB) (39,3%), le milieu *E. coli* (25,3%) et l'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) (15,6%) (Vimont *et al.*, 2006).

L'étape d'enrichissement de la matrice alimentaire est une étape très compliquée. En effet, lors de cette étape des phénomènes de compétition existent entre la flore annexe présente dans la matrice alimentaire et la bactérie recherchée. Afin de limiter au maximum ces effets de compétition bactérienne, les enrichissements peuvent être améliorés en utilisant des milieux d'enrichissement sélectifs pour un type de bactérie recherchée ou à l'inverse en limitant la croissance des bactéries non recherchées. Il a été montré que, dans 60% des cas, un antibiotique était ajouté au milieu d'enrichissement et que la novobiocine était celui le plus fréquemment utilisé (Vimont *et al.*, 2006). D'autres antibiotiques comme la vancomycine peuvent être ajoutés. Notons que des bouillons différents peuvent être employés en fonction de la matrice alimentaire testée. En effet, des composants tels que l'acri flavine (colorant qui s'intercale à l'intérieur des acides nucléiques inhibant ainsi la réplication, virale et bactérienne) peuvent également être employés. Cet intercalant est essentiellement rajouté dans

les enrichissements de produits laitiers car l'acriflavine inhibe le développement des bactéries lactique au profit des STEC (Weaver *et al.* 1996).

Notons qu'il n'existe pas à l'heure actuelle, de milieux d'enrichissement spécifiques et recommandés pour les sérogroupes autres que O157. Néanmoins, différents travaux sont menés au travers diverses études (Possé *et al.*, 2008 ; Vimont *et al.*, 2006).

3.4. Les températures et la durée d'incubation

Un autre paramètre très important est à prendre en compte lors de l'étape d'enrichissement, il s'agit de la température d'incubation. Pour *E. coli* O157:H7, il a été démontré qu'un enrichissement à 41.5 °C favorisait son développement et ralentissait la croissance des autres bactéries présentes dans la matrice alimentaire. En revanche pour les autres STEC, la situation est plus confuse. Rappelons qu'il n'existe pas de référentiel pour la recherche des STEC. Actuellement, la majeure partie des enrichissements des STEC non-O157 a lieu à 37°C. A titre d'information, un projet de spécification technique Européen pour la recherche des STEC dans les matrices alimentaires est en cours et préconise un enrichissement à 37°C pour la recherche des STEC.

La durée d'incubation (en général de 18 à 24 heures) peut également avoir un rôle important. En fonction du milieu d'enrichissement choisi, la flore annexe se développera plus ou moins et pourra avoir un impact sur la croissance de la bactérie cible.

L'effet de la flore annexe sur la flore pathogène (e.g. les STEC, *L. monocytogenes*...) est fréquemment négatif (Carlin *et al.*, 1996 ; Buchanan et Bagi, 1997 ; del Campo *et al.*, 2001). Ainsi, il est observé que la flore minoritaire (e.g. la flore pathogène) n'est pas influencée par la flore majoritaire (e.g. flore annexe) dans les premières phases de la croissance. En revanche, il a été montré que cette flore minoritaire atteint sa densité maximale (y_{max}) plus rapidement qu'en culture pure, puisque sa phase stationnaire apparaît dès lors où la flore majoritaire atteint son propre y_{max} (niveau maximal) (Jameson, 1962 ; Grau et Vanderlinde, 1992 ; Beumer *et al.*, 1996 ; Devlieghere *et al.*, 2001). Ce « freinage » simultané des flores (e.g. flore pathogène et flore annexe) au début de la phase stationnaire de la flore majoritaire est désigné sous le terme « d'effet Jameson » (Ross *et al.*, 2000), qui correspond potentiellement à l'épuisement d'une ressource limitante commune aux deux flores. Ainsi la durée d'enrichissement de la matrice alimentaire est un point crucial lors de cette étape d'enrichissement.

Pour conclure, rappelons que cette étape particulièrement délicate reste un équilibre à trouver entre l'inhibition de la croissance de la flore annexe et le développement le plus optimum de

la bactérie recherchée. Enfin, il est important de préciser que, bien que très efficaces, les enrichissements présentent l'inconvénient majeur d'augmenter considérablement le temps de détection. L'idéal serait de s'affranchir de ces étapes afin de gagner du temps, mais actuellement ceci n'est pas réalisable.

4. Les différentes méthodes de détection

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses méthodes destinées à détecter *E. coli* O157:H7 à partir de matrices plus ou moins complexes. Ces différentes techniques peuvent être classées en méthodes phénotypiques, immunologiques et génétiques. Les méthodes traditionnelles standardisées de détection des bactéries pathogènes (et d'altération) reposent sur des protocoles complexes. Ces méthodes présentent l'avantage d'avoir des niveaux de détection très bas et peuvent être utilisées sur des matrices complexes. Cependant, elles restent longues et fastidieuses. Des protocoles plus rapides ont maintenant vu le jour. Ces nouvelles méthodes reposent sur des techniques dites immunologiques (test au latex, méthode ELISA...) ou génétiques basées sur l'amplification des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN (PCR, RT-PCR...).

4.1. La détection des *E. coli* O157 :H7

☛ Les méthodes phénotypiques

La plupart des réactions biochimiques de *E. coli* O157:H7 sont typiques des *E. coli* à l'exception toutefois de la fermentation du sorbitol et de l'activité β -glucuronidase (Lingwood *et al.*, 1987). Environ 93 % des souches de *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures ; à l'inverse, *E. coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol (Neaves *et al.*, 1994). Néanmoins, il a été montré dans diverses études que des souches STEC du sérotype O157:H7 étaient capables de fermenter le sorbitol en 24 heures (Morgan *et al.*, 1993; Moxley et Francis, 1986; Wilson *et al.*, 1992). La prévalence de ces souches particulières est actuellement peu connue mais il apparaît évident que de telles souches ne peuvent être mises en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments, telles qu'elles seront décrites dans ce chapitre. En outre, 93 % des *E. coli* sont β -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne produisent pas de β -glucuronidase (Tesh *et al.*, 1991). Toutes ces caractéristiques biochimiques particulières ont été utilisées dans la conception de divers milieux sélectifs vis à vis du sérotype O157:H7. L'absence de fermentation du sorbitol, par exemple, a justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC) qui a, qui plus est, subi plusieurs modifications dans l'objectif d'augmenter

le caractère sélectif vis-à-vis de O157:H7. Ainsi, Okrend *et al.* (1990), Tesh *et al.*, (1991) ont montré que l'addition de 5 bromo-4 chloro-indoxy- β -D-glucuronide (BCIG) ajouté à raison de 0,1 g.L-1 à une gélose SMAC favorise l'isolement de *E. coli* O157 inoculé volontairement dans des échantillons de viande de boeuf. En effet, le BCIG permet de différencier les colonies β -glucuronidase positives de celles qui sont négatives sur ce milieu. *E. coli* O157:H7 présente des colonies sorbitol négatives et β -glucuronidase négatives ; ces colonies restent blanches alors que les colonies sorbitol négatives et β -glucuronidases positives virent au vert ou au bleu. L'ajout du BCIG à la gélose SMAC réduit par conséquent le nombre de faux positifs de 36 % par rapport à la simple utilisation du SMAC sans BCIG. En effet, *E. coli* O157:H7 a pu être isolé à partir de 11 des 12 échantillons de viande inoculés utilisant le SMAC-BCIG contre 8 sur 12 avec la seule utilisation du SMAC sans BCIG. Enfin, Zadik *et al.*, (1993) ont décrit l'intérêt d'ajouter du tellurite et de la céfixime à cette gélose SMAC (CT-SMAC), étant donné des concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus élevées pour les STEC O157 que pour les autres *E. coli* et les bactéries sorbitol négatives comme *Aeromonas* et *Plesiomonas*. Néanmoins, des souches de *E. coli* O157:H7 sensibles à certaines concentrations de tellurite ont été décrites par Karch *et al.* (1996) et l'utilisation de la gélose CT-SMAC dans ce cas précis s'avère inadaptée.

De plus, Thomson *et al.* (1990) ont développé un test rapide fluorescent pour la détection de *E. coli* O157. Ce test utilise le 4-méthylumbelliféryl β -D-glucuronide (MUG) comme indicateur hydrolysé en un composé fluorescent par l'enzyme β -glucuronidase (Rippey *et al.*, 1987).

De nombreux milieux chromogènes ont par ailleurs été mis au point comme par exemple les milieux CHROMagar *E. coli* O157:H7 (CHROMagar) et O157:H7 ID (bioMérieux) spécifiques du sérotype O157:H7. Ainsi les méthodes biochimiques sont intéressantes et fondamentales pour la détection de *E. coli* O157:H7 mais restent inadaptées à la détection des souches « mutantes » du sérotype O157:H7 et surtout à la détection des STEC non-O157:H7, étant donné l'absence de propriété biochimique commune à tous les STEC.

☛ Les méthodes immunologiques

Il existe actuellement sur le marché un grand nombre de tests permettant la détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments et/ou dans les échantillons environnementaux. Ces systèmes comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés.

□ Systèmes immuno-chromatographiques

Ces méthodes immunologiques en une étape donnent un résultat en 15 minutes. La préparation de l'échantillon et les phases d'enrichissement varient d'un kit immunologique à l'autre mais s'inspirent souvent des recommandations formulées par la FDA (Food and Drug Administration, USA). Les méthodes immunologiques en "une étape" sont très employées par les industriels du fait de leur rapidité d'exécution et de leur simplicité. En effet, les étapes de lavage-rinçage et d'addition de plusieurs réactifs ne sont pas nécessaires avec ces kits. Une grande partie de ces systèmes est basée sur le principe d'immuno-chromatographie. Le dispositif consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques d'*E. coli* O157:H7 (i.e. O157 et éventuellement H7), un puits pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle.

Un aliquote du bouillon d'enrichissement (généralement 100 µl) est placée dans le puit destiné à l'échantillon alimentaire puis diffuse le long de la membrane jusqu'à la zone test contenant l'anticorps anti-O157 par exemple. L'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test, après 10 à 20 minutes, indique un résultat positif signant la présence probable de *E. coli* O157 dans l'aliment. On peut citer en exemple le test « VIP EHEC » (BioControl, Montesson, France), validé par l'Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (Figure 7). Ce test permet, après un enrichissement de 18h (8h pour la matrice steak haché), de visualiser (en 10 minutes) si un échantillon donné est contaminé ou non par *E. coli* O157. Notons que ces tests ne sont pas validés ISO ou AFNOR.



Figure 7 : Test VIP EHEC

□ Les systèmes ELISA/ELFA

Ces méthodes immunologiques donnent un résultat en 2 heures en microplaque après une phase d'enrichissement (le plus souvent d'une durée de 24 heures).

Pour les systèmes ELISA, les anticorps spécifiques d'*E. coli* O157:H7 sont fixés au fond des puits de microplaques. L'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposé dans ces puits. Après incubation et une série de lavages, un anticorps "révélateur" anti-O157 est ajouté pour détecter le couple anticorps-bactéries. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique. La société r-Biopharm commercialise un test en microplaque permettant la recherche des toxines dans un bouillon d'enrichissement en 2 heures, il s'agit du kit RIDASCREEN®Verotoxin.

Basé sur le même principe la société bioMérieux® a mis au point des kits ELISA (ELFA) automatisés. Les Kit VIDAS® sont des tests employant le système VIDAS® (Figure 8).

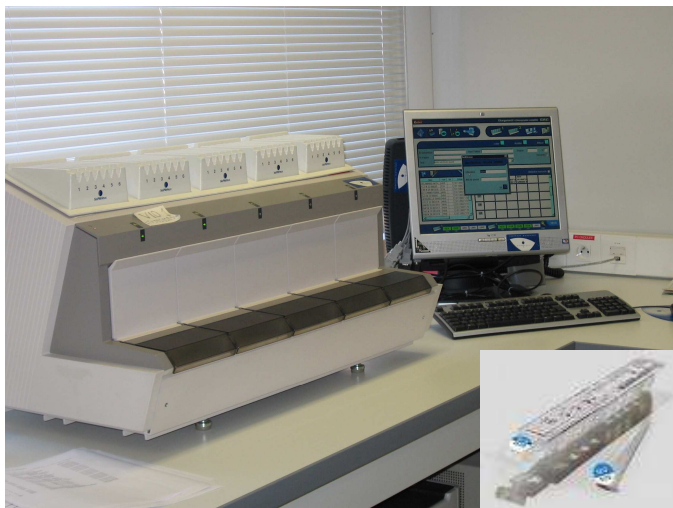


Figure 8 : l'automate VIDAS avec des cônes et des barrettes

Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps ou d'une protéine recombinante de queue de phage qui permet la capture de certaines souches de STEC (Figure 9). Les autres réactifs de la réaction ELFA sont prêts à l'emploi et sont pré-répartis dans la cartouche. Une partie du bouillon d'enrichissement est déposée dans la cartouche, puis une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel est réalisé par l'instrument. Plus précisément, les *E. coli* cibles présents sont captés par l'anticorps ou la protéine recombinante de phage (en fonction du kit utilisé) fixée à l'intérieur du cône. Les éléments restés libres sont éliminés par lavage. Ensuite, le conjugué à la phosphatase alcaline est aspiré/refoulé dans le cône et se fixe

sur les *E. coli* cibles, eux mêmes fixés sur la protéine de phage ou l'anticorps de la paroi du cône. De nouvelles étapes de lavage éliminent le conjugué non fixé. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthylumbelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthylumbellifère) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm.

A la fin du test, les résultats sont analysés automatiquement par l'instrument qui fournit une valeur de test pour chaque échantillon. Cette valeur est comparée à des références internes (seuils) et chaque résultat est interprété (positif, négatif).

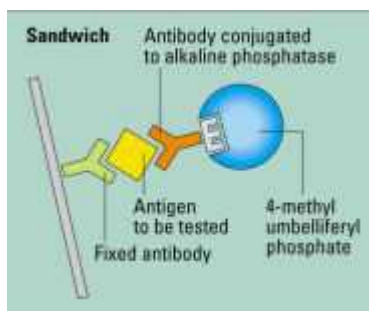


Figure 9 : Principe du VIDAS

A l'heure actuelle, la société de bioMérieux® commercialise trois kits de détection des STEC :

Le kit VIDAS ECO : permet la détection de *E. coli* O157

Le kit VIDAS EES : permet la détection concomitamment d'*E. coli* O157 et *E. coli* O26. Pour la capture des bactéries cibles, les deux kits ci-dessus utilisent des anticorps.

Le kit VIDAS UP *E. coli* O157 including H7 permet la détection spécifique des *E. coli* O157. Ce dernier est basé sur une technologie utilisant des protéines recombinantes de queue de phage.

L'ensemble des systèmes décrits précédemment (systèmes en microplaques, en une étape ou automatisés) permet aux industriels de l'agroalimentaire un contrôle "présomptif" de la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments analysés. En effet, les kits décrits précédemment ne recherchent que l'antigène somatique O157 (parfois associé à l'antigène H7). Même les systèmes qui affichent une spécificité totale pour *E. coli* O157:H7 donnent en fait des résultats positifs pour des *E. coli* O157 non-H7. Un résultat positif de l'un de ces tests immunologiques signe seulement la présence de l'antigène cible (le plus souvent, il s'agit de l'antigène somatique O157). Or, les réactions immunologiques croisées avec des espèces

bactériennes autres que *E. coli* existent lors de l'analyse de certaines matrices (e.g. viande). En effet, l'antisérum polyclonal O157 réagit également avec *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica* séro groupe O9, *Salmonella* groupe N et *Pseudomonas maltophilia* 555. A noter que l'épitope commun à toutes ces bactéries responsables des réactions croisées est le sucre 4-amino-4,6 didésoxy-D-mannose présent sur le lipopolysaccharide.

Ainsi, dans le cas d'un résultat positif, il y a nécessité de confirmer la présence du pathogène dans l'échantillon en isolant et identifiant la bactérie à l'origine du signal positif.

☛ Les méthodes génétiques

Les tests génétiques sont basés sur l'amplification de l'ADN ou de l'ARN bactérien. En conséquence, avant amplification, une étape de préparation des acides nucléiques est essentielle.

□ Préparation des acides nucléiques

Dans la littérature, de nombreuses méthodes d'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) existent, mais beaucoup d'entre elles sont longues et laborieuses. La préparation des acides nucléiques nécessite plusieurs étapes successives :

- La lyse des micro-organismes
- L'extraction des acides nucléiques
- La purification des acides nucléiques
- La concentration des acides nucléiques

Toutes ces étapes ne sont pas indispensables et parfois, le protocole se réduit à une seule étape, la lyse bactérienne qu'elle soit physique, chimique ou les deux.

L'étape de lyse peut être physique, chimique ou les deux. Rappelons que *E. coli* est une bactérie à Gram négatif, nécessitant des méthodes de lyses moins rigoureuses que celle destinées à lyser les bactéries à Gram positif. De nombreux protocoles de lyse des *E. coli* emploient la sonication ou le chauffage (Min et Baeumner, 2002). Lorsque la lyse chimique est employée, des détergents tels que le SDS ou le triton peuvent être utilisés (Uyttendaele *et al.*, 1995, 1997). D'autres auteurs ont également employé la protéinase K (Uyttendaele *et al.*, 1997 ; Min et Baeumner, 2002).

Notons toutefois qu'une préparation des échantillons qui utilise uniquement une méthode de lyse peut-être insuffisante voir inefficace. En conséquence, une préparation des acides nucléiques complète peut être choisie. Il s'agit de méthodes lourdes employant le plus souvent du phénol, du chloroforme et de l'éthanol (Gore *et al.*, 2003). De fait, des méthodes d'extraction de l'ADN

grâce à des kits d'extraction ont vu le jour. Leur principe est le suivant : la première étape consiste à lyser les bactéries (physique et/ou chimique), en parallèle, une inactivation des RNases a lieu, ensuite l'ADN est absorbé sur une membrane de silice contenue dans une colonne spéciale. Une étape de lavage de cet ADN, puis une élution est réalisée. Ces kits présentent l'avantage d'obtenir un ADN purifié et concentré, mais leur mise en œuvre nécessite beaucoup de temps. Pour réduire ce temps, il est possible d'extraire et de purifier ces acides nucléiques avec des automates d'extraction. Il existe par exemple: l'automate EZ1 commercialisé par la société Qiagen ou encore l'automate EASYMAG commercialisé par la société BioMérieux (Figure 10).

Toutes les étapes réalisées manuellement ou de manière automatique permettent de concentrer et de purifier les acides nucléiques et donc d'obtenir un meilleur seuil de détection. En effet, elles permettent d'éliminer une partie des inhibiteurs matriciels. Actuellement, très peu d'informations sont disponibles sur les inhibiteurs des réactions de biologie moléculaire et la manière de les maîtriser. Ils peuvent être issus de l'échantillon lui-même (protéines, gras, caséine....) ou de la méthode de préparation des échantillons avant analyse (composant du bouillon d'enrichissement, produit employé lors de la préparation de l'ADN.....).

De manière générale, les faux résultats négatifs qui résultent de l'action des inhibiteurs, peuvent apparaître pour diverses raisons :

- L'inactivation des enzymes du mélange réactionnel
- La dégradation ou capture des acides nucléiques (séquences cibles ou amorces)
- La lyse cellulaire insuffisante

L'utilisation des kits d'extraction permet de s'affranchir de bon nombre d'inhibiteurs de PCR. Lorsque ces kits ne sont pas employés, une dilution de l'échantillon à analyser par PCR permet de diluer les inhibiteurs présents, autorisant le plus souvent l'amplification de l'ADN cible. Cette pratique présente cependant l'inconvénient de diluer également l'ADN recherché et de diminuer ainsi la sensibilité de la PCR.



Figure 10 : Les automates d'extraction d'acides nucléiques EASYMAG de bioMérieux (à gauche) et EZ1 d'Applied Biosystems (à droite).

□ L'amplification d'ADN

Dans un souci de clarté, le paragraphe suivant sera articulé de la manière suivante. La première partie expliquera le principe général d'amplification d'ADN grâce à une méthode appelée la « Polymérase Chain Reaction » ou PCR. La deuxième partie mettra en évidence les différentes manières de révéler les produits de PCR. Enfin, la dernière partie traitera des différents types d'automates capables de réaliser une PCR. Dans cette partie, une précision sera apportée sur les kits validés pour la recherche d'*E. coli* O157.

Le principe de la PCR

La « Polymérase Chain Reaction » ou PCR est une technique de répllication ciblée in vitro. Elle permet grâce à une enzyme spécifique d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe (gras, protéine, paroi bactérienne, ADN, ARN...) d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. (Poitras et Houde, 2002).

La révélation des produits de PCR :

La mise en évidence des produits de PCR peut avoir lieu après l'étape d'amplification, il s'agit alors de la PCR en point final ou traditionnelle. Cependant, il existe depuis quelques années des techniques beaucoup plus rapides de détection des amplicons. En effet, leur détection est réalisée en même temps que les cycles de la PCR, il s'agit alors de RT-PCR (PCR en temps réel) que nous avons utilisé tout au long de nos études.

Révélation lors de la RT-PCR :

Il existe plusieurs techniques pour révéler les amplicons lors d'une RT-PCR: le SYBER-Green, les sondes d'hydrolyse, les sondes d'hybridation et les molécules Beacons.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé les sondes d'hydrolyse (Taqman et Taqman MGB). Les sondes Taqman sont faites de la façon suivante : elles sont spécifiques à la partie du génome à amplifier (contrairement aux agents intercalants comme le SYBER-Green), et sont composées d'un quencher (émetteur) qui émet de la fluorescence et d'un reporter (extincteur) qui l'absorbe (Figure 11). Lorsque la sonde est intacte (reporter et quencher à coté), le reporter absorbe la fluorescence émise par le quencher. Dans ce cas, il n'y a pas d'émission de fluorescence. Au cours de l'élongation du brin d'ADN, la taq-polymérase catalyse la sonde. Le reporter est alors séparé du quencher et émet de la fluorescence.

Récemment de nouvelles sondes ont été mises au point. Elles utilisent la technologie Taqman couplée à la technologie MGB (Minor Groove Binding) (Kutyavin *et al.*, 2000). Ces sondes sont appelées Taqman MGB. Cette technologie permet d'obtenir des sondes plus courtes tout en augmentant leur spécificité. La présence du MGB permettant également de stabiliser les cinq à six dernières bases de la sonde (extrémité 3').

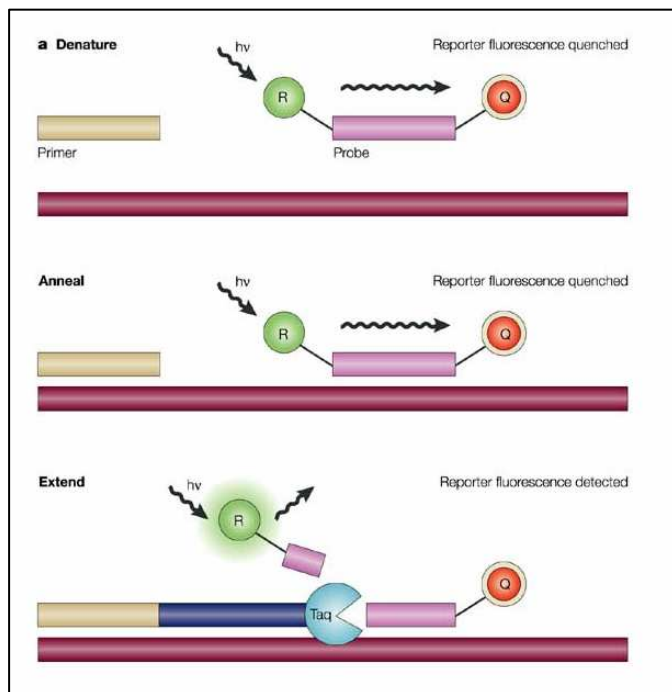


Figure 11 : Schéma du mécanisme d'action des sondes Taqman

Contrairement aux agents intercalants, les sondes Taqman offrent la possibilité de faire de la PCR multiplexe (détection de plusieurs cibles en même temps). La PCR multiplexe permet d'ajouter un contrôle interne afin de vérifier si l'amplification a bien eu lieu (absence d'inhibiteur), ou encore de détecter plusieurs pathogènes. Les sondes Taqman pouvant être couplées à plusieurs types de fluorochromes (FAM, TAMRA...) absorbant ou émettant à des longueurs d'ondes différentes, cette technologie présente l'avantage de pouvoir rechercher plusieurs cibles en parallèle contrairement aux agents intercalants.

Les limites et avantages des méthodes PCR

Les méthodes PCR pour la détection des STEC dans des matrices complexes telles que les aliments montrent cependant certains inconvénients comme l'incapacité à distinguer l'ADN des bactéries cibles de l'ADN libre, de cellules mortes ou provenant de phages. Les marqueurs détectés dans les aliments ne sont pas nécessairement présents sur la même souche et peuvent être situés sur différentes souches non pathogènes. Ainsi, une étape d'isolement est nécessaire pour récupérer la souche à l'origine des signaux PCR.

L'optimisation de la sensibilité des méthodes de PCR est un point essentiel sachant que la quantité de STEC dans les aliments est le plus souvent très faible. Un des écueils majeurs pour la mise au point de ces méthodes est la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les matrices complexes. Dans une étude réalisée par Brian *et al.* (1992), la sensibilité de la PCR était 100 fois plus faible lorsque l'ADN provenait de fèces artificiellement contaminées en STEC que lorsqu'il était extrait à partir de cultures pures. Pour limiter la présence d'inhibiteurs, plusieurs méthodes peuvent être mises en oeuvre. Tout d'abord, la phase d'enrichissement présente l'avantage, outre le fait de permettre la croissance des bactéries recherchées et par conséquent d'augmenter le nombre de cibles pour la PCR, de diluer les inhibiteurs présents dans l'échantillon. Cependant, certains protocoles sont destinés à détecter les STEC directement à partir des aliments sans enrichissement. Plusieurs auteurs ont recommandé de séparer les bactéries ou leur ADN de la matrice avant d'effectuer la PCR (Bouvet et Vernozzy-Rozand, 2000). L'ajout d'albumine sérique bovine ou d'inhibiteurs de protéases ont également été testés (Chen *et al.*, 1998). Après avoir constaté que la teneur en matières grasses de la viande hachée était un élément majeur d'inhibition, Begum et Jackson (1995) ont réussi à réduire la quantité d'inhibiteurs en diluant les échantillons d'un facteur 1000. Grâce à cette technique, ils ont pu détecter 30 STEC par ml⁻¹ de boeuf haché homogénéisé.

Un grand nombre de tests de PCR en temps réel utilisant des sondes spécifiques de *stx1* et *stx2* existent, mais la plupart ne sont pas adaptés comme outils de diagnostic car ils ne comportent pas de contrôles internes et pourraient conduire à l'obtention de faux négatifs. L'utilisation d'un contrôle interne en PCR en temps réel pour la détection spécifique des STEC a été expérimentée par Bélanger *et al.* (2002) ou Stefan *et al.* (2007). Dans les deux cas, l'amplification du plasmide contrôle interne était réalisée à l'aide d'une paire d'amorces distincte de celle utilisée pour amplifier la cible. L'inconvénient de ce principe est que cela ne reflète pas avec exactitude l'amplification de la cible du test, à cause des efficacités variables obtenues en utilisant des couples d'amorces différents. Auvray *et al.* (2009) ont développé une PCR en temps réel de type compétitif où une paire d'amorces unique sert à amplifier le contrôle interne et tous les variants de *stx1* et *stx2*, à l'exception de *stx2f*. Pour permettre la distinction des cibles amplifiées, trois sondes spécifiques de *stx1*, *stx2* et du contrôle interne ont été conçues. Après enrichissement, ce test a été en mesure de détecter des STEC dans de la viande hachée contaminée à un taux de 10 UFC de STEC / 25g.

La détection en temps réel représente l'avantage d'être plus rapide et d'éviter l'étape de détection via la réalisation d'un gel d'agarose ainsi que l'utilisation de BET qui est un agent mutagène. De plus, la RT-PCR permet de limiter les contaminations croisées qui étaient possibles lors du dépôt des amplicons sur les gels d'agarose en PCR en point final ou traditionnelle. Pour finir, grâce à la RT-PCR, il est possible de faire de la PCR quantitative, ce qui est impossible avec une étape de dépôt sur gel mais également des PCR de type « multiplexe ». Le terme de "PCR multiplexe" désigne une mise au point de la technique PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts. Le premier avantage de cette adaptation technique est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation et, éventuellement, d'analyse des résultats. Elle est donc de nature à réduire aussi la quantité d'ADN nécessaire à ces analyses.

Les automates capable de réaliser une RT-PCR

Il existe deux types d'automates sur le marché, les premiers, ceux dit « fermés ». Ces automates sont commercialisés avec un logiciel qui interprète les données afin de rendre un résultat positif ou négatif. Des kits prêts à l'emploi et spécifiques d'une bactérie ou d'une espèce bactérienne sont vendus pour ces automates. Les sociétés Genesystems ou encore Oxoid commercialisent de tels automates (voir parties suivantes : automate BAX et automate

genesystems). Les deuxièmes sont eux dit « ouverts ». Ce type d'automate se trouve essentiellement dans les laboratoires de recherche. Ces automates contiennent des logiciels qui permettent de créer des programmes de PCR spécifiques en employant leurs propres amorces. L'interprétation des résultats est réalisée par le manipulateur. Ce type d'automate nécessite une bonne connaissance en biologie moléculaire et est inadapté aux analyses de routine. Par exemple, l'automate Lightcycler de Roche ou encore l'automate Stepone d'Applied Biosystems permettent ce type d'analyses.

Les appareils « ouverts » étant plus connus, nous détaillerons par la suite le principe et le fonctionnement des appareils dits fermés employés pour détecter *E. coli* O157:

L'automate BAX :

BAX est un automate de détection microbienne pour la recherche des pathogènes et des flores d'altération (Figure 12) dans les aliments. BAX® System Q7 est un système de détection PCR en temps réel. La détection en temps réel de l'ADN se fait grâce à un fluorochrome, le SYBER-Green. La quantification est basée sur l'augmentation de fluorescence générée par le mélange SYBER-Green lorsqu'il est intercalé dans le double brin d'ADN. Il est important de souligner un abus de langage, l'automate BAX Q7 ne permet pas une détection en temps réelle mais plutôt une détection en point finale. En effet, la mesure de la fluorescence due au SYBER-Green n'est pas mesurée tout au long du cycle de la PCR mais à la fin du programme d'amplification. L'automate BAX® System Q7 permet donc en 3h30 de détecter simultanément des bactéries. Ce temps comprend 2h30 de cycle de PCR et 1h de détection.



Figure 12 : Automate BAX® system Q7

L'automate Genesystems:

L'automate Genesystems appelé « GeneDisk Cycler » est un outil de diagnostic des légionelles, des *Listeria*, des salmonelles ou encore des STEC (ainsi que de leurs facteurs de virulence). L'automate est relié à un logiciel permettant d'analyser les données. En plus de l'automate, la société Genesystems a mis au point un extracteur pour la préparation des échantillons d'ADN (GeneExtract).

L'automate Genesystems fonctionne avec des disques à usage unique constitués de microchambres préchargées en réactifs nécessaires à la détection et quantification des cibles recherchées. L'ADN extrait des échantillons à analyser est ensuite placé dans un réservoir se situant sur la partie centrale du disque (figure 13). Ce disque est appelé un « GeneDisc ».

Un « GeneDisc » permet d'analyser 6 échantillons à la fois. La société Genesystems a mis au point un « GeneDisc » qui permet la détection des gènes ciblant le sérotype de *E. coli* O157 et des facteurs de virulence *eae* (facteurs attachement d'effacement), *stx1* et *stx2* (correspondant au Shiga-toxine 1 et 2). Afin d'éviter les erreurs, chaque analyse est réalisée en double dans les « GeneDisc ».



Figure 13 : Automate et disque Genesystems

L'automate Bio-Rad et le test iQ-Check *E. coli* O157:H7 :

Le test iQ-Check *E. coli* O157:H7 repose sur la technique PCR en temps réel. La détection et l'analyse des résultats sont réalisées avec un thermocycler pour la PCR en temps réel Bio-Rad (tel que chromo4 ou MiniOpticon (Figure 14))



Figure 14 : Automate chromo4 à gauche et automate MiniOpticon à droite

Ces automates permettent la réalisation d'une PCR. Lors de l'amplification une sonde de type Beacon (sonde brevetée) s'hybride sur la séquence cible permettant l'émission de fluorescence. La lecture de fluorescence se fait au moment de l'hybridation. Le logiciel associé à l'appareil calcule automatiquement la relation entre l'intensité de fluorescence et le cycle d'amplification. Cette relation indique la présence ou l'absence présumptive de *E. coli* O157:H7 dans la prise d'essai analysée. Un ADN synthétique « contrôle interne » est amplifié en même temps que la séquence cible.

La durée de la PCR est comprise entre 2h20 et 2h30 et un kit IQ-Check contient la quantité de réactifs nécessaire pour 96 analyses (réactifs et billes de lyse, sondes fluorescentes, solution d'amplification, contrôle négatif et positif).

Il est important de noter que l'ensemble de ces kits de détection n'est validé que pour un domaine d'application particulier (fromage, viande crue de bœuf...), et que le protocole d'enrichissement varie en fonction des kits (durée d'enrichissement, prise d'essai, bouillon d'enrichissement...).

Le test HQS *E.Coli* O157:H7 (ADNucleis):

Le test HQS *E. coli* O157:H7 repose sur la technique PCR associée à la détection utilisant le SYBERgreen (Figure 15). Cette méthode permet la détection des *E. coli* O157:H7 après un enrichissement de 12 à 24 heures à 37°C en bouillon PCRone®.

Le kit est constitué d'un mélange réactionnel d'extraction d'ADN génomique, d'un kit de purification des ADN et de tubes de réaction PCR destinés à l'obtention d'amplicons

spécifiques d'*E. coli* O157:H7. L'interprétation des résultats se fait à partir des graphiques et des données de la qPCR.

Ce test présente la particularité d'être validé AFNOR pour une utilisation sur les thermocycleurs suivants :

- Applied Biosystems : ABI 70000 / 7300 / 7500 / 7900
- Qiagen : Rotorgene
- Eppendorf : Realplex
- Stratagene : MX3005P



Figure 15 : Kit HQS *E. coli* O157:H7 commercialisé par la société ADNucleis

4.2. La détection des autres STEC

Les différentes méthodes décrites pour la détection des STEC non-O157 reposent essentiellement sur la détection de la production des Shiga-toxines, en général après une étape d'enrichissement. Plusieurs tests ELISA ont été décrits. Certains d'entre eux utilisent des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine Stx, tandis que d'autres sont basés sur la propriété des Shiga-toxines à se lier aux glycolipides présentant une terminaison α -D-Gal-(1-4)-D-Gal, des récepteurs Gb3 purifiés, du lyso- Gb3 ou du liquide de kyste hydatique. Dans les différents protocoles, la détection est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre la toxine *stx*, et la révélation avec des anticorps liés à la phosphatase alcaline. Cependant, ces méthodes ne se sont pas révélées aussi sensibles que le test sur cellules Vero. En outre, sachant que les variants *stx* n'ont pas tous la même

antigénicité et les mêmes propriétés de fixation, leur détection n'est pas garantie (Smith and Scotland, 1993).

Parmi les kits ELISA disponibles, on peut citer le « Premier EHEC » ciblant les Shiga-toxines (Meridian Diagnostics Inc, USA) et qui a été évalué dans les selles par Kehl *et al.* (1997) et par Mackenzie *et al.* (1998). Ce test est effectué en microplaques directement à partir des échantillons ou après enrichissement et il a été jugé adéquat pour la détection des STEC en routine. Le « Premier EHEC » a également été comparé par Willford *et al.* (2009) avec deux autres kits ELISA disponibles dans le commerce, le « Ridascreen Verotoxin Enzyme Immunoassay » (rBiopharm, Germany) et le « ProSpecT Shiga-Toxin *E. coli* Microplate Assay » (Remel Inc.) qui sont réalisés en microplaques à partir d'un échantillon enrichi. En revanche, les trois tests se sont montrés incapables de reconnaître les variants Stx2d et Stx2e ce qui indique que les souches de STEC exprimant ces variants ne seront pas détectées par ces méthodes.

Des kits utilisant la technique de « *reverse passive agglutination assay* » (RPLA) adaptés à la détection des toxines *stx* ont également été conçus et commercialisés. Cette technique met en jeu des billes enduites d'anticorps qui interagissent avec les Shiga-toxines et produisent une couche diffuse à la base des puits où se déroule la réaction. Karmali *et al.* (1999) ont comparé à partir de cultures pures le kit « VEROTOX-F » (Denka Seiken, Japon) avec le test sur cellules Vero et ont observé une sensibilité de 0,7 ng.ml⁻¹ et 0,6 ng.ml⁻¹ pour *stx1* et *stx2* respectivement. Ce test pouvait détecter *stx1*, *stx2* et le variant *stx2c*. Le « VTEC RPLA » (Unipath Limited, Royaume-Uni) a été évalué par Beutin *et al.* (1996) à partir de surnageant de culture pure de STEC pathogènes traité avec de la polymyxine. Les souches de STEC testées ont ainsi été isolées et le variant *stx1* ou *stx2* a été déterminé de façon fiable en 72 à 96 heures. Un autre kit, le « STEC-Screen « Seiken » RPLA » a également été évalué et comparé avec le test sur cellules Vero par Beutin *et al.* (2002), à partir d'échantillons de selles. Ce test s'est montré précis, rapide, facile d'utilisation et adapté à l'examen en routine.

Des méthodes d'immunochromatographie utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des Shiga-toxines ont été également développées. Ces méthodes permettent une détection rapide, en moins de 10 min pour le « Duopath verotoxin test » (Merck, Germany) (Park *et al.*, 2003). Ce test a été comparé au « Premier EHEC », utilisé comme référence, et a montré une absence de réaction croisée avec d'autres organismes entériques.

La méthode IMS a également été adaptée à la détection et l'isolement des souches appartenant aux 5 sérogroupes majeurs de STEC, à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes O26, O111, O103 et O145 (disponibles dans le commerce, Dynal

Ltd, Norvège). Toutefois, les souches isolées par cette méthode doivent être confirmées pour la présence du gène *stx* avant d'être considérées comme des souches de STEC. Ces billes magnétiques n'ont pas été certifiées ISO comme l'IMS pour *E. coli* O157:H7, mais ont été employées pour aider à récupérer des souches de STEC à partir d'échantillons alimentaires (Auvray *et al.* 2007).

Il n'existe pas de méthode validée normalisée pour la recherche des STEC non-O157 dans les aliments. Toutefois, quelques méthodes sont disponibles sur le marché. Il existe par exemple, une méthode génétique : la société Genesystems a mis au point un « GeneDisc » qui permet la détection simultanément des gènes ciblant les sérotypes d'*E. coli* O26, d'*E. coli* O103, d'*E. coli* O111, d'*E. coli* O145 et du gène ciblant FliC H7. Ce système utilise les amorces validées et décrites par Perelle *et al.* (2004).

Il existe un grand nombre de tests en PCR conventionnelle pour la détection des gènes *wzx* et *wzy* impliqués dans la constitution des antigènes somatiques O26, O103, O111 et O145 (Wang *et al.*, 1998 ; Debroy *et al.*, 2004 ; Fratamico *et al.*, 2005, Fratamico *et al.*, 2009). Des modèles de détection par PCR en temps réel des gènes *wzx* de O26, *wbdI* de O111, *wzy* de O145 ont également été conçus (Perelle *et al.*, 2004, Fratamico *et al.*, 2009). Les PCR en temps réel pour la détection de *wzx*-O26, *wzx*-O103, *wbdI*-O111 et *rfbE*-O157 ont été combinés avec le marqueur *ihpI*-O145 au sein d'une multiplex pour réaliser le criblage d'échantillons alimentaires d'origine bovine (Perelle *et al.*, 2007).

Une méthode immunologique, le VIDAS EES est également disponible. Celle-ci permet la détection simultanée des *E. coli* O157 et O26 sans pouvoir faire la distinction entre les deux.

La demande se faisant de plus en plus forte et l'apparition des sérogroupes autres que O157 étant de plus en plus fréquente dans les épisodes épidémiques, un projet de normalisation d'un protocole visant à leur détection est actuellement à l'étude (Figure 16).

Organisation internationale de normalisation
Les Normes internationales pour les entreprises, les gouvernements et la société

Accueil **Produits** Elaboration des normes Actualités et médias L'ISO Pour les membres

Produits > Normes ISO > par TC > TC 34 Produits alimentaires > SC 9

ISO Store
Normes ISO
par ICS
» par TC
Comment utiliser la liste des normes ISO
Les normes de management
Le portefeuille sectoriel de l'ISO
FAQ
Codes pays (ISO 3166/MA)
Répertoire des normes relatives à l'aérospatiale
Publications et produits électroniques
Droit d'auteur

ISO/WD TS 13136

Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour la détection d'Escherichia coli produisant des Shiga-toxines (STEC) appartenant aux séro-groupes O157, O111, O26, O103 et O145 -- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qualitative en temps réel

Informations générales

Nombre de pages:

Edition: 1	ICS: 07.100.30
État: Projet	Stade: 20.99 (2009-03-03)
TC/SC: TC 34/SC 9	

Figure 16 : Projet de normalisation d'une méthode de recherche des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.

Ce protocole repose sur deux grandes étapes : le dépistage puis la confirmation (Figure 17). L'étape de dépistage consiste en un enrichissement puis à la détection dans le bouillon en premier lieu des facteurs de virulence (*eae* et *stx*) par une technique de PCR en temps réel et si l'échantillon est positif pour ces deux cibles alors on recherchera par PCR également s'il y a présence ou non d'un ou plusieurs des 5 sérogroupes. Les amorces et sondes utilisées sont celles publiées par Perelle *et al.* (2004,2005) et Nielsen *et al.* (2003).

Si l'un des 5 sérogroupes est détecté, on passera à l'étape de confirmation qui consiste en une immunoconcentration bactérienne puis à un isolement sur géloses. Si des colonies caractéristiques apparaissent, alors il faudra confirmer que ces colonies appartiennent bien au séro groupe suspecté et les caractériser.

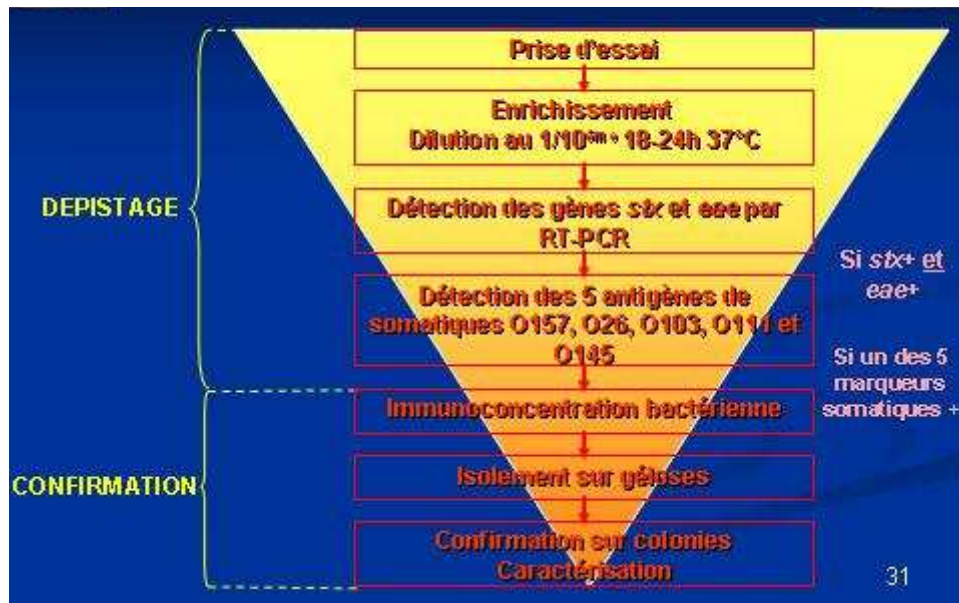


Figure 17 : Projet de normalisation : protocole de recherche des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.

5. L'étape de confirmation

L'ensemble des tests cités précédemment permet seulement de donner un résultat présomptif sur la présence de STEC dans la prise d'essai analysée. Après un résultat positif que ce soit avec une méthode immunologique ou encore génétique, il est toujours obligatoire de réaliser une confirmation de ce résultat. Cette étape passe entre autre par l'isolement et l'identification de la bactérie cible recherchée (séro groupe, flagelles, présence des facteurs de virulence...).

Pour les souches *E. coli* O157, il existe deux méthodes d'isolement validées: l'IMS et le VIDAS ICE. Pour les STEC non-O157, seule l'IMS existe.

L'IMS pour Immuno Séparation Magnétique permet de rechercher et d'isoler les *E. coli* appartenant aux 5 sérogroupes (reconnus pathogènes par l'AFSSA) présentes dans le bouillon d'enrichissement.

Le principe de ces différentes méthodes est détaillé dans les paragraphes suivants.

5.1. L'immuno-séparation magnétique (IMS)

La séparation immuno-magnétique (IMS) reprise dans la norme ISO EN 16654 est une méthode qui utilise des particules paramagnétiques couvertes d'anticorps spécifiques de l'organisme cible, ajoutées à l'échantillon d'aliment à analyser. L'organisme cible est capturé à la surface des particules magnétiques qui sont isolées de l'échantillon par application d'un aimant. En lavant puis diluant les cellules cibles ainsi isolées dans un volume inférieur à celui duquel elles proviennent, un effet de concentration des cellules bactériennes est obtenu et

ainsi la sensibilité des systèmes de détection est augmentée. Les billes sont ensuite mises en culture sur des milieux sélectifs. Les colonies caractéristiques sont ensuite confirmées à l'aide de tests biochimiques (galeries API, bioMérieux®) immunologiques (test d'agglutination latex O157, recherche des Shiga-toxines par ELISA) et génétiques (PCR).

Il existe des particules paramagnétiques pour les 5 sérogroupes considérés comme pathogènes par l'AFSSA.

5.2. L'immuno-concentration *E. coli* (ICE)

Le VIDAS *Immuno-Concentration E. coli* O157 (ICE) est une méthode entièrement automatisée permettant la concentration sélective d'*E. coli* O157 à partir de bouillons d'enrichissements alimentaires. Elle améliore la performance de l'isolement sur milieu gélosé. En effet, l'ICE permet de purifier le bouillon d'enrichissement (élimination du gras, des protéines...) mais aussi d'éliminer une partie de la flore annexe présente dans le bouillon. La durée du test est de 40 minutes.

Comme pour les kits de détection, le kit VIDAS *Immuno-Concentration E. coli* O157 est composé de deux éléments prêts à l'emploi :

- un cône à usage unique qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage.

L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti- *E. coli* O157 adsorbé sur sa surface.

- une cartouche qui contient les solutions de lavage et de relargage

Une partie aliquote du bouillon d'enrichissement est placée dans la cartouche et subit un cycle d'aspiration refoulement. Les bactéries *E. coli* O157 présentes dans le milieu se fixent sur les anticorps anti- *E. coli* O157 de l'intérieur du cône. Les éléments restant libres sont éliminés par lavage. Une étape finale relargue les bactéries *E. coli* O157 capturées dans un puit spécial de la cartouche. Toutes ces étapes sont réalisées automatiquement par le module analytique VIDAS. Un isolement de cette solution est ensuite réalisé sur gélose chromogène. Cette technique présente également l'avantage de limiter les contaminations croisées liées à la manipulation des échantillons.

5.3. Les différents milieux d'isolement

Isolement des *E. coli*

Il existe une grande diversité de milieux, certains sont spécifiques d'une espèce (*E. coli*) comme le milieu Coli ID (bioMérieux)(Figure 18) et le milieu Rapid'*E.coli*2 (Bio-RAD)

(Figure 19). Ces milieux sont des milieux chromogènes permettant le dénombrement des coliformes et d'*E. coli*. Il contient deux substrats chromogènes. Les coliformes autres qu'*E. coli* apparaissent sous forme de colonies bleues, grâce à la mise en évidence de la β -galactosidase; les colonies d'*E. coli* apparaissent violettes/roses grâce à la mise en évidence de la β -glucuronidase.. Les géloses sont incubées 18/24 heures à 37°C. Ces milieux sont utilisés dans la norme ISO 16654.

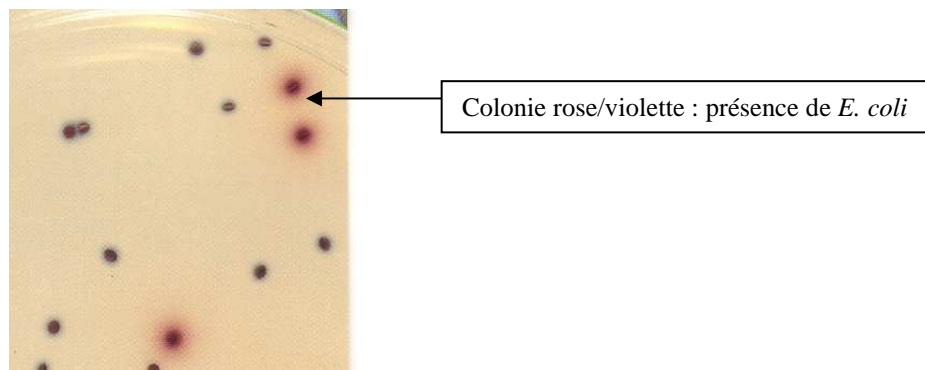


Figure 18 : Colonie d'*E. coli* sur milieu Coli ID (bioMérieux)

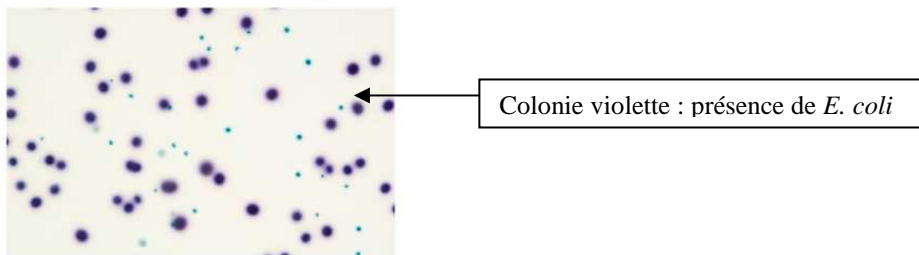


Figure 19 : Colonie d'*E. coli* sur le milieu Rapid'*E. coli* 2 (BIO-RAD)

Isolement des *E. coli* O157:H7

Des milieux spécifiques du sérotype O157:H7 sont aussi disponibles comme le milieu MacCONKEY Sorbitol (CT-SMAC)(Figure 20). Sur ce milieu, la microflore secondaire est inhibée par l'association entre les sels biliaries, le cristal violet, le céfixime et le tellurite de potassium. Après 24 heures d'incubation à 37°C, *E. coli* O157:H7 forme des colonies lisses, incolores, pouvant présenter un halo orangé d'alcalinisation. Ce milieu est utilisé dans la norme ISO 16654.



Figure 20 : Colonie d'*E. coli* O157:H7 sur milieu MacCONKEY

Un deuxième milieu spécifique d'*E. coli* O157:H7 existe : le milieu ChromID O157:H7(BioMérieux)(figure 21). Cette gélose contient un mélange d'hydrates de carbone et deux substrats chromogènes pour la détection de deux activités enzymatiques :

la β -D-galactosidase présente chez toutes les souches d'*E. coli* quel que soit leur sérotype et la β -D-glucuronidase spécifique à toutes les souches d'*E. coli* non O157:H7.

La sélectivité vis-à-vis des bactéries Gram (+) est apportée par le désoxycholate de sodium. Pour augmenter sa sélectivité vis à vis des entérobactéries, le milieu chromIDTM O157:H7, peut être additionné du mélange Céfixime-Tellurite (CT). Après incubation, les colonies caractéristiques de *E. coli* O157:H7 ont une coloration verte à vert-bleu.

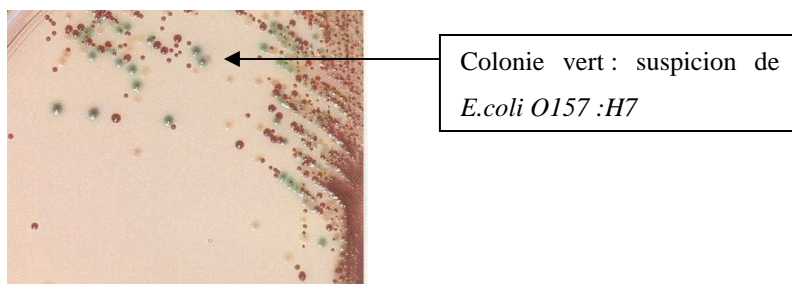


Figure 21 : Colonie d'*E. coli* O157:H7 sur milieu ChromID O157:H7

Le milieu BBL CHROMagar O157 commercialisé par la société Becton Dickinson sert aussi à l'isolement, la différenciation et l'identification présumée d'*E. coli* O157:H7 (Figure 22). En raison de la présence de substrats chromogènes dans le milieu, les colonies d'*E. coli* O157:H7 produisent un colorant de couleur mauve, ce qui permet leur identification présumée à partir de la boîte de Pétri.

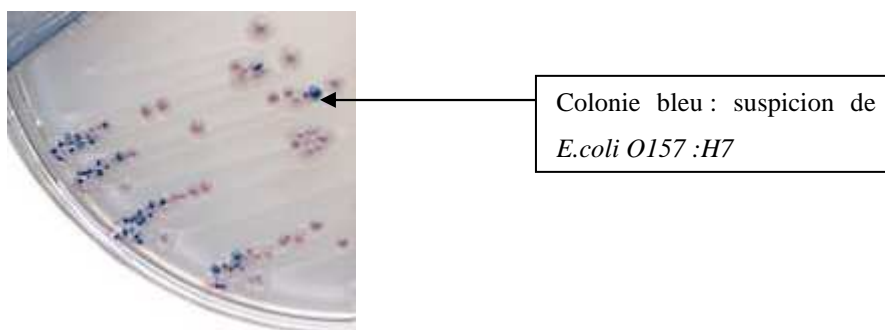


Figure 22 : Colonie d'*E. coli* O157:H7 sur milieu BBL CHROMagar O157

Isolement des STEC non-O157:H7

En ce qui concerne la recherche des autres souches de STEC, l'identification sur gélose est beaucoup plus fastidieuse. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes rendant possibles l'utilisation de milieux d'isolements particuliers. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose "entérohémolysine". La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de moutons lavés, additionnés d'ions Ca²⁺ (Beutin *et al.*, 1989). Mais il y a des limites à cette méthode (Beutin *et al.*, 1996). D'autre part, une proportion de STEC non-O157 et STEC O157 fermentant le sorbitol, peuvent ne pas produire l'entérohémolysine et ne sont donc pas détectées sur gélose au sang (Bielaszewska *et al.*, 1998). Enfin la présence d'un grand nombre de souches non STEC produisant une hémolysine peut gêner le repérage des colonies suspectes sur gélose au sang.

B.Posse *et al* (2008) ont mis au point un protocole permettant d'isoler et de détecter les quatre autres sérogroupes (O26, O103, O111, O145). Après un enrichissement approprié, les colonies sont isolées sur des géloses contenant entre autre des antibiotiques et un substrat (X-gal). Ces différents composants permettent de différencier phénotypiquement les STEC non-O157. Les souches utilisées pour la mise en œuvre de ce protocole étaient issues de patient malade. Il s'agit donc de souches ayant résisté à de nombreux paramètres comme le passage dans l'estomac des patients, rendant certainement ces souches plus résistantes. L'hypothèse que des souches stressées peuvent avoir des difficultés à se développer sur un tel milieu entraînant l'apparition de faux résultats négatifs peut être émise. De la même façon, l'utilisation d'antibiotiques peut entraîner l'apparition de faux résultats négatifs. En effet, certaines souches peuvent être plus ou moins sensibles aux antibiotiques et donc ne pas être détectées ensuite alors qu'elles étaient pourtant présentes.

Après enrichissement de la matrice à analyser, détection immunologique ou génétique de la bactérie cible puis isolement (grâce à une immuno-concentration) sur gélose des bactéries, une dernière étape est encore nécessaire : la recherche des facteurs de virulence de la bactérie par PCR ou RT-PCR. En effet, rappelons que selon la définition de l'AFSSA une souche STEC est dite pathogène si elle appartient à un des cinq sérogroupes (O26, O103, O111, O145, O157) et qu'elle possède les facteurs de virulence *eae* et *stx*. Ces caractéristiques génétiques peuvent être mise en évidence en utilisant les amorces publiées par Perelle *et al.*(2004, 2005) concernant les serogroupes et les gènes *stx* et par Nielsen et Andersen (2003) concernant le gène *eae*.

6. Les méthodes validées

En raison des besoins croissants de rapidité, de praticabilité et de fiabilité d'analyse, de nombreux kits commerciaux sont utilisés sur le marché de l'analyse microbiologique. Or les utilisateurs de ces kits ont besoin de garanties quant à leurs performances. C'est pourquoi l'AFNOR Certification a mis en place un système de validation de ces méthodes commerciales, qui assure, via une procédure très sérieuse de certification, que les résultats obtenus avec les kits commerciaux sont équivalents aux résultats obtenus avec les méthodes normalisées.

La marque AFNOR VALIDATION, largement reconnue en France depuis les années 1990, bénéficie aujourd'hui d'une notoriété importante au niveau européen et international. C'est une certification européenne à part entière, à côté des systèmes de Validation techniques constitués par NordVal (Validation intergouvernementale des 5 pays nordiques) et l'AOAC (Validation technique nord-américaine).

6.1. Pour *E. coli* O157

Le premier protocole (Figure 23) à avoir été normalisé pour la recherche des *E. coli* O157 dans les aliments est celui de la norme NF EN ISO 16654 qui repose sur la technique d'immunoséparation magnétique (IMS) décrite précédemment (Chapitre 2, 4.a).

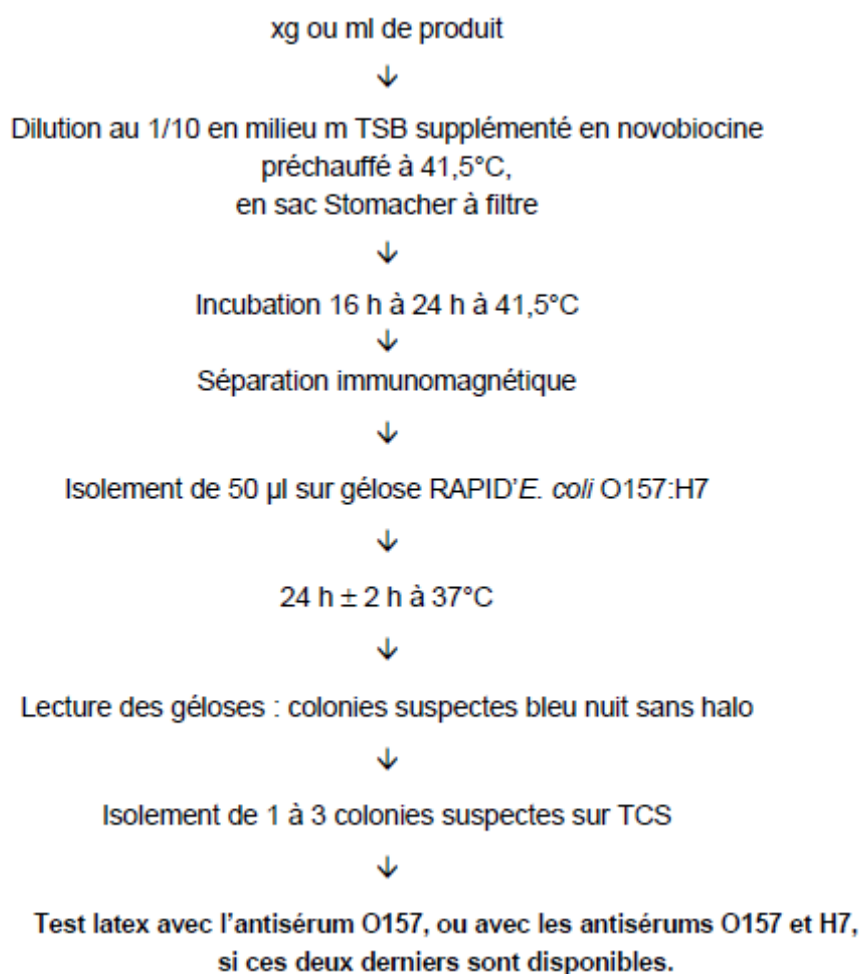


Figure 23 : Protocole de recherche des *E. coli* O157 dans les aliments suivant la norme NF EN ISO 16654.

D'autres méthodes ont ensuite vu le jour afin d'améliorer la praticabilité des analyses. Les industriels de l'agroalimentaire ont donc à leur disposition de nombreux outils immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments mais une préférence doit toutefois être accordée à des tests officiellement validés (i.e. AFNOR, ISO, AOAC) afin de prendre un risque minimum dans la gestion du devenir de lots considérés suspects.

En France, les méthodes validées AFNOR de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment sont répertoriées dans le tableau qui suit :

Tableau 8 : Méthodes validées AFNOR pour la détection des *E. coli* O157

Nom commercial	Type de méthode	Certifié AFNOR Validation
HQS <i>E.coli</i> O157:H7	PCR Détection des <i>E. coli</i> O157	ADNucleis
VIDAS UP <i>E.coli</i> O157 including H7	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>E. coli</i> O157	BIOMERIEUX SA
Vidas <i>E. coli</i> O157 (ECO)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>E. coli</i> O157	BIOMERIEUX SA
RAPID'<i>E.coli</i> O157:H7	Milieux de culture Détection des <i>E. coli</i> O157	BIO-RAD
iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7	PCR Détection des <i>E. coli</i> O157	BIO-RAD
BAX® <i>E. coli</i> O157:H7 MP	PCR Détection des <i>E. coli</i> O157	DuPont Qualicon
BAX® Real-Time PCR Assay <i>E.coli</i> O157:H7	PCR Détection des <i>E. coli</i> O157	DuPont Qualicon
GeneDisc <i>E. coli</i> O157:H7	PCR Détection des <i>E. coli</i> O157	Pall GeneSystems

Aux Etats-Unis, on parlera des méthodes validées AOAC pour la recherche des *E. coli* O157. Elles sont répertoriées dans le tableau en annexe (annexe 1).

6.2. Les autres

Concernant les autres sérogroupes, il n'existe pas de méthodes. Les seules méthodes validées AFNOR sont des méthodes permettant la recherche de tous les *E. coli* sans distinction possible et sont essentiellement des milieux de culture (tableau 9).

Tableau 9 : Méthodes validées AFNOR pour la détection des *E. coli*.

Nom commercial	Type de méthode	Certifié AFNOR Validation
Test 3M™ Petrifilm™ Select <i>E. Coli</i>	Milieux de culture Dénombrement des <i>E. Coli</i>	3M Health Care
REBECCA BASE (REBECCA+EB)	Milieux de culture Dénombrement des <i>E. Coli</i>	AES Chemunex
Gelose Coli-ID	Milieux de culture Dénombrement à 37°C des <i>E. Coli</i> β-Glucuronidase positive	BIOMERIEUX SA
Gelose Coli-ID	Milieux de culture Dénombrement à 44°C des <i>E. Coli</i> β-Glucuronidase positive	BIOMERIEUX SA
Tempo EC	Milieux de culture Dénombrement des <i>E. Coli</i>	BIOMERIEUX SA
Rapid <i>E. Coli</i> 2 (<i>E. Coli</i> à 37°C)	Milieux de culture Dénombrement des <i>E. Coli</i> à 37°C	BIO-RAD
Rapid <i>E. Coli</i> 2 (<i>E. Coli</i> à 44°C)	Milieux de culture Dénombrement des <i>E. Coli</i> à 44 °C	BIO-RAD

Concernant les méthodes validées AOAC, il n'existe que des méthodes permettant la détection conjointe des *E. coli* et des Coliformes (Annexe 2).

Mémoire expérimental

Comme il a été décrit précédemment, la plupart des méthodes pour la recherche des *E. coli* concernent le sérotype O157.

Pour les autres sérotypes, O26, O103, O111 et O145, il n'existe à ce jour aucune méthode de détection validée par les autorités. Bien évidemment, la communauté scientifique utilise des méthodes telles que la PCR ou l'IMS afin de détecter et d'isoler ces bactéries dans les bouillons d'enrichissement de matrices alimentaires. Cependant ces méthodes non validées restent à améliorer et semblent difficiles à mettre en œuvre par les industriels ou les laboratoires de routine.

Pourtant l'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008, et plus récemment celui du 11 janvier 2011 (2010-SA-0031) recommandent de rechercher les cinq sérotypes dans les aliments à risque puisque tous ont été impliqués dans des épidémies ou des cas sporadiques d'infection à STEC. Il est donc urgent de mettre en place des méthodes de détection destinées aux industriels des filières les plus pointées du doigt (viande et fromage) ainsi qu'aux laboratoires d'analyses de routine.

L'ampleur de la tâche étant considérable, l'objectif de ce travail était donc d'optimiser certaines étapes des protocoles de détection en fonction des attentes et des impératifs des industriels mais aussi des événements récents tels que les épidémies et autres cas observés de contamination liés aux STEC.

CHAPITRE 1 : Matériel et méthodes

1. Les souches

Des souches de diverses origines ont été utilisées au cours des études qui seront présentées par la suite (Tableau 1). La plupart sont d'origine alimentaire et ont été isolées au laboratoire dans le cadre d'autocontrôles demandés par des industriels. Les autres souches ont été retrouvées dans des échantillons d'environnement, de fèces de bovins ou encore chez des patients malades.

Parmi ces souches, un grand nombre sont des *E. coli* appartenant à l'un des cinq sérogroupes considérés comme pathogènes par l'AFSSA : *E. coli* O26, O103, O111, O145 et O157 (AVIS N°2008-SA-0122).

- Pour l'étude développée dans le chapitre II : « Mise au point d'un enrichissement pour la recherche d'*E. coli* O26 dans les fromages au lait cru », trois souches d'*E. coli* O26 provenant de fèces de bovins ont été utilisées. A l'heure actuelle, il n'existe pas de gélose permettant de différencier les *E. coli* O26 des autres STEC ; c'est pourquoi dans cette étude ces souches ont été marquées. Elles ont été électroporées par un plasmide (pGFPuv) portant un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène codant une protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein). Par ailleurs, 0.25µg d'ampicilline ont été ajoutés aux suspensions de bactéries afin de ne conserver que les cellules contenant le plasmide (pression de sélection). Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur des géloses LBA (Luria-Bertani Agar) contenant 150µg/ml d'ampicilline. Après incubation 18 à 24h à 37°C, les colonies caractéristiques étaient fluorescentes et vertes sous lumière ultra-violette.

Notons qu'une étude préalable avait montré que la transformation des souches n'avait pas d'impact sur leur croissance (Fremaux *et al.* 2006, et Vimont *et al.* 2007). En effet les souches transformées et les souches parentales présentaient les mêmes cinétiques de croissance. Par ailleurs, la même étude avait montré la stabilité du plasmide dans les souches dans des conditions sélectives (apport d'antibiotique).

La figure ci-dessous présente le plasmide utilisé ainsi que les colonies transformées visualisées sous lumière ultra violette.

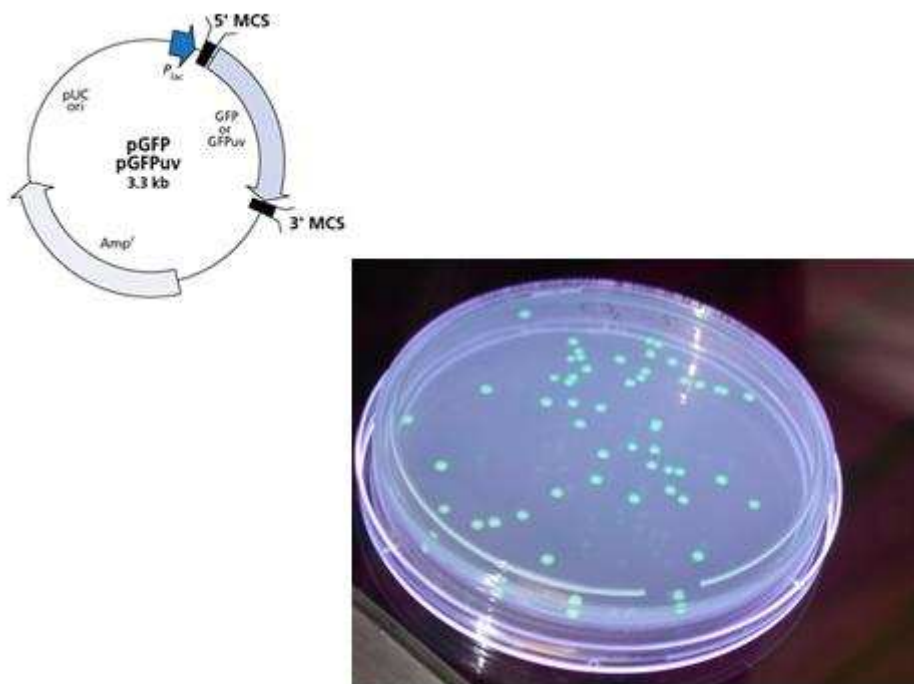


Figure 24 : A gauche schéma du plasmide utilisé, à droite, apparence des colonies sur gélose PCA supplémentée en ampicilline.

- En ce qui concerne l'étude détaillé dans le Chapitre III : « Evaluation des performances du VIDAS ECPT UP », cinq souches appartenant au sérotype d'*E. coli* O157:H7 ont été sélectionnées. Il s'agit de souches isolées dans les différents réservoirs des STEC. En effet, ces souches proviennent de l'alimentation, des fèces, de l'environnement ou encore de cas humains.

- Pour finir, lors de la troisième étude visant à mettre au point une immuno-concentration des cinq sérogroupes majeurs de STEC (Chapitre IV), un grand panel de souches ont été utilisées. Dans un premier temps, cinq souches de chacun des cinq sérogroupes (O26, O103, O111, O145, O157) ont permis de tester la spécificité mais aussi la sensibilité de la méthode. Des souches appartenant à d'autres sérogroupes ou encore des bactéries non *E. coli* comme des *Citrobacter* ont servis à évaluer la spécificité de la méthode. Notons qu'un faible nombre de souches a été testé pour la spécificité, une fois la méthode mise au point, un plus grand nombre de souches bactériennes sera expérimentée.

Dans un souci de clarté, le tableau 1 indique pour les deux premières études quelles souches ont été utilisées. Le tableau précise aussi l'origine des souches ainsi que leurs caractérisations (sérogroupes, facteurs de virulence...).

Tableau 10 : Souches utilisées lors des études 1 et 2.

	Souche	origine	Sérogroupe	Gène eae	Gène stx com	Gène stx 1	Gène stx 2
1	E9	Fèces bovins	O26:H11	+	+	+	-
1	90,6	Fèces bovins	O26:H11	+	+	+	-
1	5,9	Fèces bovins	O26:H11	+	+	+	-
2	B177	Abattoir bovins	O157:H7	+	+	-	+
2	A33-35	Fèces bovins	O157:H7	+	+	-	+
2	261	Aliment	O157:H7	+	-	-	-
2	ENV 166	Environnement	O157:H7	+	+	-	+
2	LS 27	Aliment	O157:H7	+	+	+	+

1 : souches utilisées dans le chapitre II : Mise au point d'un enrichissement pour la recherche d'*E.coli* O157 et d'*E.coli* O26

2 : souches utilisées dans le Chapitre III : Optimisation du VIDAS ECPT UP

Concernant le chapitre IV (Mise au point d'une immuno-concentration des cinq sérogroupe), un panel de souches plus important a été utilisé. Il est composé de :

- 10 souches de *E. coli* O26
- 10 souches de *E. coli* O103
- 4 souches de *E. coli* O111
- 7 souches de *E. coli* O145
- 10 souches de *E. coli* O157
- 9 souches de *E. coli* n'appartenant pas à l'un des 5 sérogroupe précédents
- 2 souches non-*E. coli* : un staphylocoque et un *Citrobacter*.

Leurs caractéristiques sont décrites en annexe (annexe 1).

2. Les matrices alimentaires utilisées au cours de l'étude

Les études épidémiologiques ont montré que les aliments le plus souvent impliqués dans les épidémies à STEC étaient la viande de bœuf insuffisamment cuite et les fromages au lait cru. Ainsi, nous nous sommes donc attachés à optimiser la détection des STEC, particulièrement dans ces deux types de matrices

2.1. Les produits laitiers

Des produits laitiers à base de lait cru ont été utilisés pour permettre la mise au point et l'évaluation d'un enrichissement pour la recherche d'*E. coli* O26. Une dizaine de produits laitiers appartenant à différentes technologies fromagères ont été testés (tableau 11). Du lait

de vache et de chèvre (matière première des fromages) du jour de la traite (J0) et le même lait stocké 3 jours à 4°C (J+3) ont également été analysés. L'objectif de cette double analyse était d'observer un éventuel impact du développement de la microflore du lait à 4°C sur la détection d'*E. coli* O26 lors de l'enrichissement.

Tableau 11 : Technologies fromagères et matrices fromagères utilisées

Technologie Fromagères	Matrices	Origine du lait
Pâtes fraîches	Fromage blanc	Vache
Pâtes fermes cuites	Cantal	Vache
Pâtes molles croûtes fleuries	Camembert	Vache
Pâtes pressées	Saint nectaire	Vache
	Lait cru de vache	Vache
	Lait cru de chèvre	Chèvre
Pâtes molles persillées	Roquefort	brebis
Pâtes pressées croûtes lavées	Reblochon	Vache
Pâtes fraîches avec affinage	Crottin de chavignol	Chèvre
Pâtes fermes cuites croûte morgée	Comté	Vache

2.2. Les produits carnés

Une grande variété de produits carnés, et plus particulièrement de viande de bœuf, a été testée au cours de l'évaluation des performances du VIDAS ECPT UP (Chapitre III) mais aussi pendant la phase finale du projet sur la mise au point de l'immuno-concentration des 5 sérogroupes majeurs de STEC (Chapitre IV).

Nous avons notamment choisi des viandes avec des types de conditionnement particuliers : la viande hachée fraîche, sous vide, sous atmosphère modifiée mais aussi de la viande congelée.

2.3. Ensemencement expérimental des matrices

Pour réaliser les différentes études, les matrices alimentaires ont été expérimentalement inoculées aux taux voulus avec différentes cultures de STEC. Des ensemencements faibles ont

été réalisés (1 à 10 UFC/ml) (UFC : Unité Formant Colonie) afin de reproduire les contaminations habituellement rencontrées dans les industries alimentaires.

A partir de cryobilles stockée à -80°C , les souches bactériennes ont été mises en culture dans de l'EPT (18/24h à 37°C). Afin de s'assurer de la pureté des souches, un isolement du tube EPT a été réalisé sur gélose SMAC. Après croissance, une colonie a été inoculée dans un tube EPT (18/24h à 37°C). Une série de dilution au 1/10ème a ensuite été effectuée dans des tubes de TS. Cette gamme de dilution a été utilisée pour contaminer artificiellement les matrices alimentaires aux taux voulus. Afin de connaître la quantité exacte de bactéries ensemencées, pour chaque gamme de dilution, un dénombrement a été réalisé sur géloses nutritives (Trypticase Soja Agar (TSA)). Dans le but d'éviter des biais de manipulation, les inoculations artificielles ont été réalisées de manière aléatoire et en triplicata (Figure 25).

Par ailleurs, chaque matrice ensemencée a été stockée à $+4^{\circ}\text{C}$ toute une nuit afin de mimer ce que subissent les souches dans les entreprises agroalimentaires.

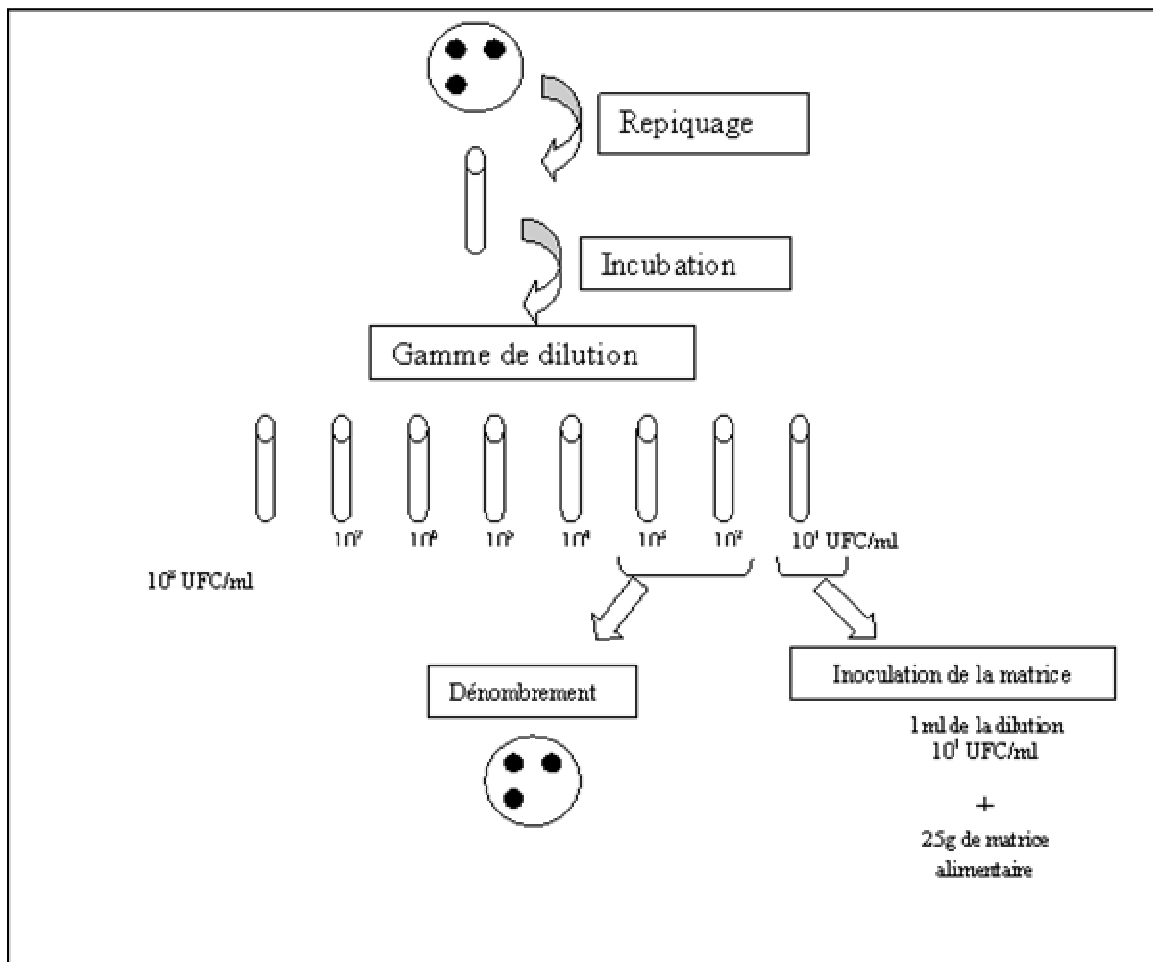


Figure 25 : Protocole d'inoculation des matrices

3. Les milieux sélectifs

Divers géloses ont été utilisées au cours des études :

- la gélose PCA (Plate Count Agar) pour le dénombrement de la flore totale.
- la gélose Coli ID pour l'isolement des *E. coli* tous sérogroupes confondus (Biblio., Chap. 2, 4b).
- la gélose Chrom ID O157:H7 pour l'isolement des *E. coli* O157:H7 (Biblio., Chap. 2, 4b).
- la gélose Bjorn Possé pour l'isolement des *E. coli* O26, O103, O111 et O145 (Figure 26).

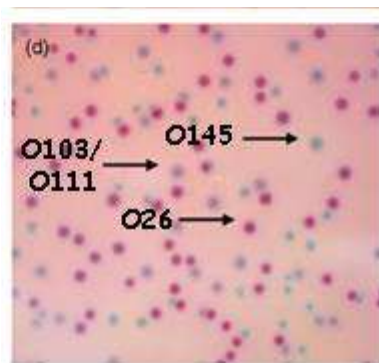


Figure 26 : Colonies O26, O103, O111 et O145 sur la gélose B. Possé.

4. Les différents kits VIDAS utilisés

Deux tests VIDAS ont été utilisés au cours de nos différentes études.

- Le VIDAS EES (E.E. coli Serogroup) permet la détection simultanée d'*E. coli* O157 et d'*E. coli* O26. Les cônes de ce test sont tapissés par des anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O157 et O26.
- Le VIDAS ECPT UP permet la détection d'*E. coli* O157. Il comporte des cônes tapissés de protéines de phages dirigées contre l'antigène somatique O157 (Figure 27).

Pour réaliser l'analyse, 1ml du bouillon d'enrichissement a été respectivement chauffé chauffé 15 min à 95°C pour le VIDAS EES et 5 min pour le VIDAS ECPT UP, puis 500 ml de bouillon chauffés ont été introduits dans une barrette VIDAS selon les recommandations de bioMérieux. Les barrettes et les cônes ont ensuite été introduits dans l'automate VIDAS pour être analysés. A la fin du cycle, une valeur de RFV est donnée par le système analytique

de l'automate. C'est elle qui permet de déterminer si oui ou non le test est positif. Elle est interprétée de la manière suivante :

$$\text{Valeur du test} = \text{RFV échantillon} / \text{RFV standard}$$

Si la valeur du test est supérieure ou égale au seuil défini pour le paramètre recherché, alors le test est positif. Pour le VIDAS EES, cette valeur est de 0,10 et pour le VIDAS ECPT UP de 0,04.

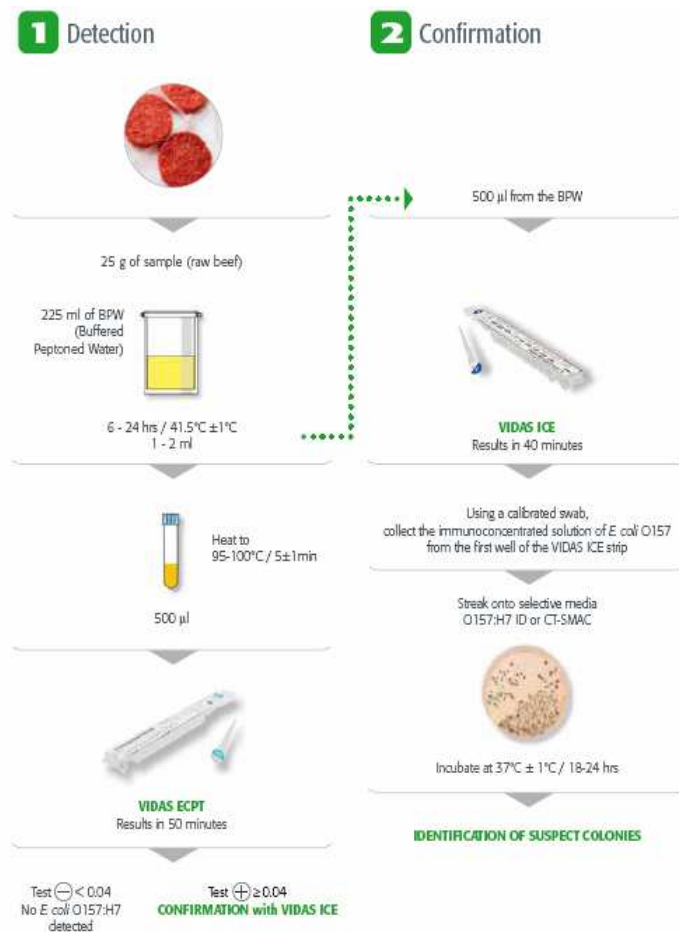


Figure 27 : Protocole d'utilisation du VIDAS ECPT.

5. La Real Time PCR (RT-PCR)

Cette technique a été utilisée pour les deux études décrites dans les chapitres III et IV.

L'extraction d'ADN a été réalisée selon les recommandations du kit Prepman commercialisé par la société Applied Biosystems : 1 mL du bouillon d'enrichissement a été prélevé dans un microtube vissé puis une centrifugation de 2 min à 13 000 rpm (centrifugeuse 5415 D, eppendorf) a été effectuée. Après cette étape, le surnageant a été éliminé et le culot mélangé avec 200µL de solution PREPMAN par aspiration-refoulement grâce à une micro-pipette.

Enfin, pour permettre à la solution PREPMAN d'agir, le microtube vissé a été chauffé 10 min à 100 °C. Après refroidissement (environ 2min à température ambiante) le microtube a de nouveau été centrifugé 2 min à 13 000 rpm (centrifugeuse 5415 D, eppendorf). Le surnageant a pu alors être analysé par RT-PCR.

La RT-PCR (Real Time Polymérase Chaîne Reaction) utilisée pour les différentes études a été mise au point au sein du laboratoire, elle est détaillée ci-dessous :

Le kit de RT-PCR utilisé est le Master Mix d'Applied Biosystems (TaqMan gene expression Master Mix). La RT-PCR a été réalisée sur l'automate StepOne d'Applied Biosystems. Le volume d'échantillon ajouté au mix de RT-PCR était de 3µl pour un volume final de 30µl de Mix. Les concentrations et volumes des différents composants du mix sont répertoriés dans les tableaux 12 a) et b).

Tableau 12 : Composition du mix de RT-PCR :

a) Pour la détection des gènes *stx 1* et *stx 2* (amorces à 1000nM et sondes à 200nM) :

	Pour le <i>stx 1</i> et <i>2</i> - Volumes en µL
nombre de tubes	1
Master Mix (2X)	15
MgCl ₂ (25mM)	3,6
H ₂ O	0,6
IPC Mix (10X)	3
Amorces <i>stx1-1</i> 1 à 20pmol/µL	1,5
Amorces <i>stx1-2</i> 2 à 20pmol/µL	1,5
Sonde <i>Stx1</i> (10µM)	0,6
Sonde <i>Stx2</i> (10µM)	0,6
IPC DNA (50X)	0,6
ADN (par puits)	3

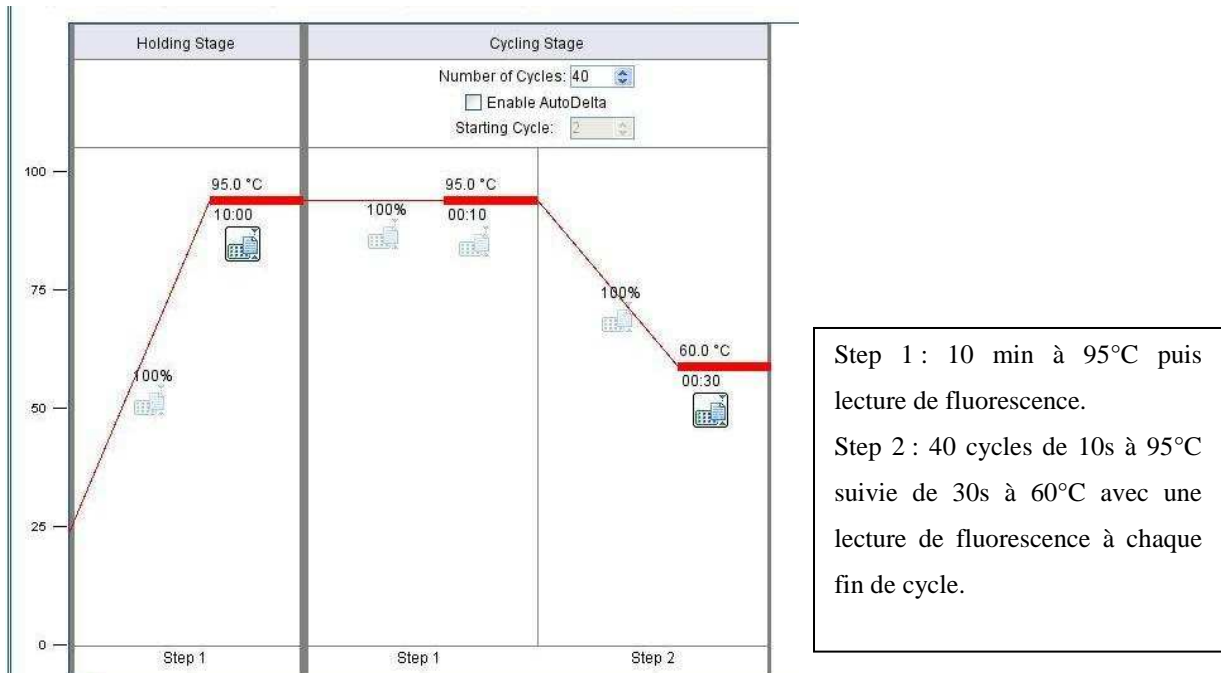
b) Pour la détection des gènes *eae* (amorces à 600nM et sonde à 200nM), O111 (amorces à 1000nM et sonde à 200nM) et des gènes codant pour les antigènes somatiques O26, O103, O145 et O157 (amorces à 500nM et sonde à 200nM) :

	eae - Volumes en μL	O157, O26, O103 et O145 - Volumes en μL	O111 - Volumes en μL
Nombre de tubes:	1	1	1
Master Mix (2X)	15	15	15
H₂O	4,2	4,8	1,8
IPC Mix (10X)	3	3	3
Amorces x2 (10μM)	1,8	1,5	3
Sonde (10μM)	0,6	0,6	0,6
IPC DNA (50X)	0,6	0,6	0,6
ADN (par puits)	3	3	3

L'amplification est évaluée par l'augmentation de la fluorescence du reporter (sonde) et ceci à chaque cycle d'amplification. Au préalable, le programme d'analyse du StepOne d'Applied Biosystems calcul le bruit de fond du mix+ADN. Son cycle d'amplification figure dans la figure 28. Cette RT-PCR cible le gène codant pour la synthèse de l'antigène somatique recherché. Les amorces utilisées sont celle recommandées par l'AFSSA (Perrelle *et al.*, 2004) et par Nielsen and Andersen (2003) (Tableau 13). Les résultats sont analysés en fonction du C_T (Cycle Threshold). Le C_T correspond au nombre de cycles d'amplification réalisés au moment où la courbe d'amplification dépasse la limite de positivité (Threshold).

Figure 28 : Cycles d'amplification de la RT-PCR : a) pour *eae* et les sérogroupes ; b) pour *stx 1* et 2.

a)



b)

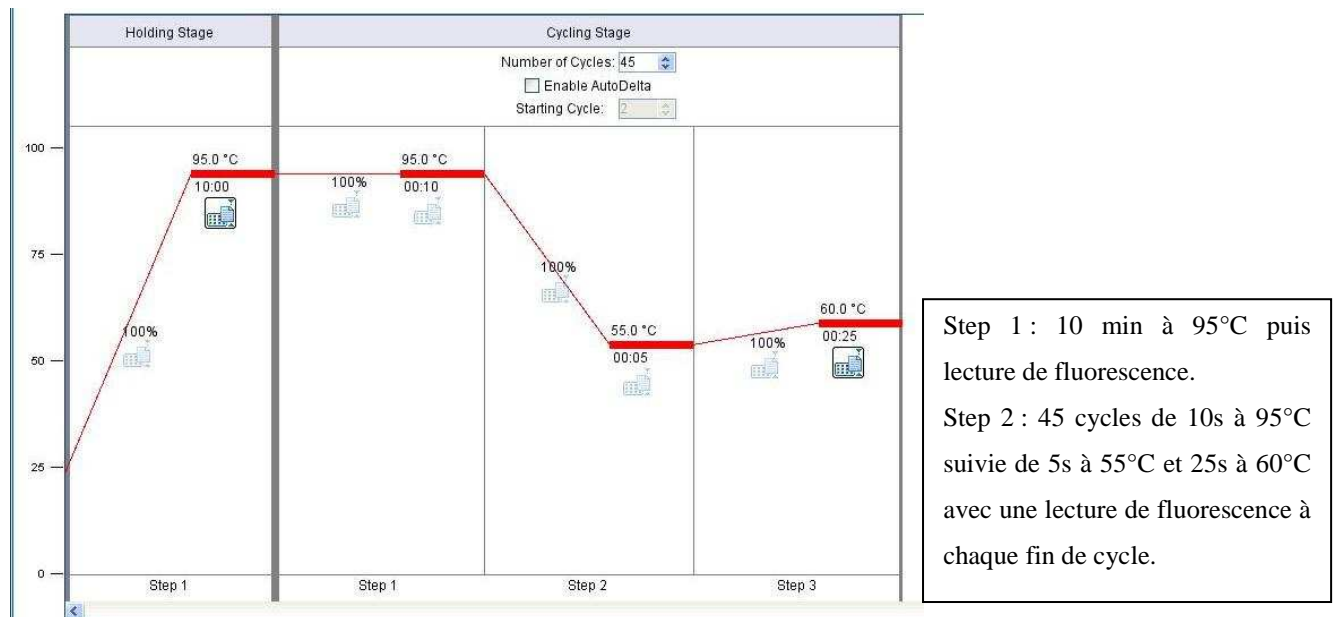


Tableau 13 : Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour la RT-PCR (Nielsen and Andersen, 2003 ; Perelle *et al.*, 2004)

Cible :	Amorces de chez MWG, séquence de 5' à 3' et Sondes (soit de MWG, soit d'Applied Biosystems) :	
<i>eae</i>	RT - EAE 1	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA
	RT - EAE 2	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA
	RT - Eae MGB (Applied)	FAM - TCGCCAGTATTCGC - NFQMGB
O111	RT - wbdI (O111) 1	CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT
	RT - wbdI (O111) 2	TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C
	RT - wbdI (O111) (<i>de MWG</i>)	FAM - TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA - TAM
O26	RT - wzx (O26) 1	CGC GAC GGC AGA GAA AAT T
	RT - wzx (O26) 2	AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT
	RT - wzx O26 MGB (Applied)	NED - TCAATACTATTTACAGAGGTTG - NFQMGB
O145	RT - ihp1 (O145) 1	CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG
	RT - ihp1 (O145) 2	GCC GCC GCA ATG CTT
	RT - ihpI O145 MGB (Applied)	NED - ATTCAGAATGCACACAAT - NFQMGB
O103	RT - wzx (O103) 1	CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT
	RT - wzx (O103) 2	GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT
	RT - wzx O103 MGB (Applied)	FAM- CATAGCCTGTTGTTTTAT -NFQMGB
O157	RT- rfbE (O157) 1	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A
	RT- rfbE (O157) 2	CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT
	RT- rfbE	FAM- ATTCCTCTCTTTCCTCTGC -NFQMGB (brin complémentaire)
Stx1 et stx2	RT - STX12 1	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG
	RT - STX12 2	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC
	RT - STX 2 (Applied)	FAM- TCGTCAGGCACTGTC -NFQMGB
	RT- STX 1 (Applied)	NED- AGAACGCCCACTGAGA -NFQMGB (brin complémentaire)

6. L'IMS

La méthode standardisée ISO EN 16654 utilisant l'Immuno Séparation Magnétique (IMS) a été réalisée à titre de comparaison avec les méthodes évaluées dans toutes les études menées. Le protocole ISO repose sur une dilution de la prise d'essai au 1/10^{ème} dans le milieu d'enrichissement du mTSB (bouillon trypticase soja modifié) contenant de la novobiocine à une concentration de 20mg/L et enrichie pendant 24h à 41.5°C. Un aliquote de 1mL de bouillon d'enrichissement est prélevé pour réaliser l'immuno-concentration.

L'immuno-concentration a été réalisée à l'aide de billes magnétiques de type Dynabeads® (Invitrogen®) selon les recommandations de l'industriel (Figure 29). Puis les billes ont été étalées sur des géloses plus ou moins spécifiques à la bactérie ciblée. Après incubation des géloses pendant 24 heures à 37°C, les colonies suspectes isolées ont été analysées grâce à leurs caractéristiques biochimiques (galerie API 20E BioMérieux®) ainsi que des tests latex ciblant l'antigène spécifique à la bactérie recherchée (Oxoid®) mais aussi en réalisant des PCR sérogroupales sur un panel de colonies suspectes.

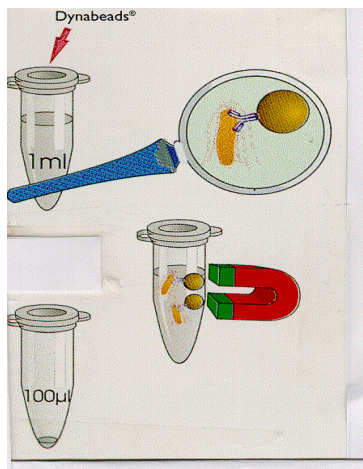


Figure 29 : Schéma de la réaction d'immuno séparation magnétique.

Résultats

CHAPITRE 2: Optimisation de la phase d'enrichissement pour la détection des *E. coli* O26 et O157 dans les fromages au lait cru français

1. Introduction

Les épidémies liées aux STEC ont surtout mis en cause de la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, mais également des produits laitiers. Le lait cru a rarement été associé à des épidémies humaines, cependant, les fromages au lait cru ont, quant à eux, été impliqués dans des cas sporadiques ou épidémiques (Casenave *et al.*, 1993 ; Deschenes *et al.*, 1996 ; CDC 2000).

Le 25 novembre 2005, le service de réanimation pédiatrique du centre hospitalier universitaire de Caen a signalé à l'Institut de veille sanitaire, la survenue en une semaine de 3 cas de SHU pédiatriques. Le même service signalait 3 autres cas entre le 29 novembre et le 3 décembre. Ces 6 enfants, âgés de 10 mois à 2 ans avaient présenté une diarrhée glairo-sanglante entre le 10 et le 28 novembre, compliquée par un SHU entre le 17 novembre et le 1^{er} décembre. L'examen des selles des 6 enfants a permis d'isoler 2 souches d'*E. coli* O26 et la présence de Shiga-Toxine par PCR dans les selles de tous les enfants. L'enquête épidémiologique a montré que ces enfants avaient consommé du camembert au lait cru. Les analyses bactériologiques des fromages incriminés ont mis en évidence la présence de souches de *E. coli* O26, suggérant que ces enfants avaient été contaminés par les fromages.

Notons que quelques mois avant cette épidémie, avait été identifié un cas groupé de SHU (2 enfants et 2 cas de diarrhées sanglantes) au sein d'une même famille ayant consommé du fromage au lait cru de chèvre contaminé par *E. coli* O157 (Espié *et al.* 2006).

En 2007, les Français sont parmi les premiers consommateurs au monde de fromages (24 kg/hab/an). Les fromages au lait cru sont des produits à forte valeur ajoutée, ils ont ainsi une importance économique non négligeable : leur production représente environ 16% de la production nationale de fromages affinés. La consommation annuelle française de fromage, y compris les frais (fromages blancs, petits suisses ou fromages salés) s'élève à 25,1 kilos par

habitant, dont 16,9 kilos de fromages affinés diversifiés et 8,3 kilos de fromages frais (fromages blancs, petits-suissees ou fromages frais salés).

La France occupe la deuxième place au sein de l'Union Européenne, devancée par la Grèce.

Le risque de contamination des denrées d'origine animale est fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées notamment en abattoir, lors de la traite et dans les ateliers de transformation. Des études plus particulièrement menées sur les fromages au lait cru ont montré que certaines souches de STEC sont capables de survivre, voire de se développer dans certains types de fromages. Il semble que la protection lactique de ces produits ne soit pas suffisante pour inhiber ce pathogène.

Le problème majeur de ces matrices est qu'il existe peu de leviers d'action destinés à limiter le développement des STEC lors de la fabrication des fromages. En effet, les différentes technologies appliquées permettent de garantir les qualités organoleptiques spécifiques de chaque type de fromage. Cependant, l'étape de coagulation du lait nécessite une température élevée (aux alentours de 37°C), autorisant non seulement le développement des bactéries lactiques, mais également celui des bactéries pathogènes qui sont éventuellement présentes. La fin de la fabrication des fromages, notamment l'affinage permet souvent une diminution du pathogène, mais ne l'élimine pas toujours.

Des épidémies répétées pourraient mettre en péril cette filière qui souffre déjà et qui est fortement décriée sur la scène commerciale Européenne et mondiale.

Ces différents éléments montrent l'importance et l'urgence de la mise au point de protocoles destinés à rechercher ce pathogène notamment dans les fromages au lait cru.

2. Résumé

L'objectif principal de cette étude était d'optimiser l'étape d'enrichissement de fromages au lait cru en amont d'une détection des souches de *E. coli* O26 avec une nouvelle méthode immunologique automatisée, le VIDAS EES. Le Camembert ayant récemment été incriminé dans une épidémie à *E. coli* O26, et le Reblochon ayant été identifié par nos soins comme un fromage issu d'une technologie fromagère complexe et à risque, il a été décidé d'approfondir la recherche d'un enrichissement sur ces deux matrices. Une fois l'enrichissement sélectionné, il a été évalué sur un nombre plus important de fromages issus de différents procédés de fabrication français.

Pour se faire, dix bouillons d'enrichissement ont été testés pour la détection de souches *E. coli* O26. Deux enrichissements sont apparus efficaces et ont permis une croissance de *E. coli* O26 suffisante pour que les bactéries soient détectées par le test VIDAS dans ces deux types de fromage. Ces deux enrichissements ont ensuite été évalués sur des fromages ayant subi des processus de fabrication différents, et donc ayant des caractéristiques biologiques et physico-chimiques différentes. Finalement, c'est l'eau peptonée tamponnée supplémentée avec le céfixime-tellurite et l'acriflavine qui est apparue comme le bouillon d'enrichissement le plus approprié : Il a permis une croissance suffisante des *E. coli* O26 pour qu'ils soient détectés dans les fromages après une incubation de 24 h. Malgré un faible niveau d'inoculation de 1 à 10 UFC/25g, notre étude a montré que cet enrichissement permettait d'atteindre 5.10^4 *E. coli* O26 /mL après 24 heures d'enrichissement à 41.5°C. Le seuil de détection du VIDAS EES ayant été atteint l'automate a donc rendu des résultats positifs confirmant la présence de nos *E. coli* O26 pour l'ensemble des matrices testées avec cet enrichissement après 24 h d'incubation.

L'optimisation de l'enrichissement des *E. coli* O26 et l'existence d'une méthode permettant leur détection constitue une avancée dans l'établissement d'une procédure qui pourrait être utilisée en routine pour détecter les *E. coli* O26 dans les fromages au lait cru.

3. Publication n°1

Cette étude a fait l'objet d'un article soumis dans « Letters in Applied Microbiology » et d'un poster présenté à l'ASM (American Society for Microbiology) en juin 2008 à Boston (annexe 4).

ORIGINAL ARTICLE

Optimized enrichment for the detection of *Escherichia coli* O26 in French raw milk cheeses

F. Savoye, C. Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal and D. Thevenot

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

Keywords

detection, *E. coli* O26, enrichment, raw milk products.

Correspondence

Fanny Savoye, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, Marcy l'Etoile F-69280, France.
E-mail: f.savoye@vetagro-sup.fr

2010/1892: received 21 October 2010,
revised and accepted 3 March 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03044.x

Abstract

Aims: Our main objective was to optimize the enrichment of *Escherichia coli* O26 in raw milk cheeses for their subsequent detection with a new automated immunological method.

Methods and Results: Ten enrichment broths were tested for the detection of *E. coli* O26. Two categories of experimentally inoculated raw milk cheeses, semi-hard uncooked cheese and 'Camembert' type cheese, were initially used to investigate the relative efficacy of the different enrichments. The enrichments that were considered optimal for the growth of *E. coli* O26 in these cheeses were then challenged with other types of raw milk cheeses. Buffered peptone water supplemented with cefixim–tellurite and acriflavin was shown to optimize the growth of *E. coli* O26 artificially inoculated in the cheeses tested. Despite the low inoculum level (1–10 CFU per 25 g) in the cheeses, *E. coli* O26 counts reached at least $5 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹ after 24-h incubation at 41.5°C in this medium.

Conclusions: All the experimentally inoculated cheeses were found positive by the immunological method in the enrichment broth selected.

Significance and Impact of the Study: Optimized *E. coli* O26 enrichment and rapid detection constitute the first steps of a complete procedure that could be used in routine to detect *E. coli* O26 in raw milk cheeses.

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are recognized as important human foodborne pathogens (Blackburn and McCarthy 2000). These bacteria are implicated as the agent causing haemorrhagic colitis and are also associated with haemolytic uraemic syndrome (HUS).

Escherichia coli O157:H7 has monopolized the headlines since the early 1980s (Riley *et al.* 1983; Morgan *et al.* 1993; Upton and Coia 1994; Pritchard *et al.* 2000; Dobson 2006). This notoriety is justified as this serotype has caused frequent outbreaks (Gillespie *et al.* 2005). However, other serotypes such as *E. coli* O26, *E. coli* O103, *E. coli* O111 and *E. coli* O145 can also cause outbreaks (Pearce *et al.* 2006).

Indeed, STEC O26 has been increasingly associated with diarrhoeal disease (Carroll *et al.* 2005) and has been frequently linked to outbreaks (Hiruta *et al.* 2001;

McMaster *et al.* 2001; Weber *et al.* 2002) and cases of HUS (Liptakova *et al.* 2005; Sayers *et al.* 2006). In different countries, *E. coli* O26 has been detected in meat and dairy products (Steele *et al.* 1997; Hussein and Sukuma 2005; Murphy *et al.* 2005). In France, one outbreak linked to unpasteurized cow's milk 'Camembert' cheese contaminated by *E. coli* O26 occurred in December 2005 (Espie *et al.* 2006). In October 2007, an outbreak of STEC O145 and O26 occurred among consumers of ice cream produced and sold at a farm in the province of Antwerp (Belgium) (De Schrijver *et al.* 2008).

In France, dairy products and more particularly raw milk cheeses represented 15.6% of the production of French cheeses in 2005. Pathogenic bacteria that can be transmitted by raw milk cheese are of great concern to the dairy industry. Detailed investigations have demonstrated that the sources of contamination in raw milk are due to hygienic problems during milking or postprocess-

ing contamination with organisms originally derived from raw milk or from manufacturing environments (Little *et al.* 2008).

Sensitive and rapid detection methods for *E. coli* O26 are necessary for the food industry and more particularly for French raw milk cheese manufacturers to ensure a safe supply of foods. The development of optimized methods for enrichment, detection, isolation and confirmation of *E. coli* O26 presents some challenges for the French raw milk cheese industry.

In raw milk cheeses, the presence of high levels of background flora can influence the growth of STEC (Vimont *et al.* 2007) and make difficult its subsequent detection. One must be aware that the combination of ingredients, including the chemical composition of milk and the nature of the starter cultures used, together with the characteristics of fermentation and ripening contribute to the many physical, chemical and microbiological differences in the different types of French cheeses (Montel 2004). All these technical parameters constitute a hurdle to establishing a single enrichment for this large range of dairy products. Detection methods of non-O157 STEC are still evolving. However, there is still no commercially available automated method for *E. coli* O26 detection.

The main aims of this study were to optimize the enrichment of *E. coli* O26 in raw milk products and to evaluate the performance of a new automated immunological method, VIDAS system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), for the detection of *E. coli* O26. The effect of different enrichment broth formulations on the growth of *E. coli* O26 experimentally inoculated in a variety of French raw milk cheeses was investigated prior to the automated immunological detection.

Materials and methods

Escherichia coli O26 strains used

Three STEC strains from our collection, belonging to the O26 serogroup isolated from faeces of different French dairy cattle, were used in this study. The genetic characteristics of the strains were determined by RT-PCR (Table 1). RT-PCR assay for the detection of *wzx* genes that encode for O26 serogroup, *stx 1* and *stx 2* genes that encode for Shiga toxins and *eae* gene that encodes for the intimin adherence protein were used (Nielsen and Andersen 2003; Perelle *et al.* 2004). All strains were maintained and stored at -80°C .

Cheese samples

Two categories of raw milk cheeses, semi-hard uncooked cheese and 'Camembert' type cheese, were used in an initial

Table 1 Characteristics of *Escherichia coli* O26 used

	Reference	Origins	Serogroup	Virulence factors		
				<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Strain 1	E9	Faeces of dairy cattle	O26	+	+	-
Strain 2	90-6	Faeces of dairy cattle	O26	+	+	-
Strain 3	5-9	Faeces of dairy cattle	O26	+	+	-

study to preselect different factors that could enhance selectivity of the enrichment media for *E. coli* O26.

Once the formulation was considered optimal, its application to other types of raw milk cheeses was investigated: soft cheese, blue mould cheese and uncooked hard cheese, all of them manufactured in France.

Inoculation of samples

The three *E. coli* O26 strains were individually cultured in buffered peptone water (BPW) (bioMérieux) at 37°C for 18–24 h and serially diluted in tryptone salt (bioMérieux). The three strains were inoculated individually in cheeses at a level of 1–10 CFU per 25 g in triplicate. To determine the cell numbers in the initial inoculum, 100- μl aliquots from serial dilutions of 10^5 , 10^6 and 10^7 CFU ml^{-1} were plated on tryptic soy agar (bioMérieux), incubated at 37°C for 24 h and counted. One sample of each type of cheese was left uninoculated and used as negative control. After inoculation, the samples were stored overnight at 4°C to cold-adapt the strains and to simulate normal storage conditions of raw milk.

Enrichment protocol

A total of ten enrichment media were tested. Most of them consisted of BPW with or without antibiotics. Table 2 gives the list of the enrichment broths tested with STEC O26 experimentally inoculated in 'Camembert' and semi-hard uncooked cheese.

In the first part of this study, only two types of raw milk cheeses were used to evaluate the ten enrichment broths. More precisely, 225 ml of each test enrichment broth was added to a stomacher bag containing 25 g of artificially inoculated cheese, stomached for 1 min and then incubated for 24 h at 41.5°C . A total of 180 experimentations were performed in the first part of the study.

After choosing the optimal enrichment broth for the growth of *E. coli* O26 inoculated in the two types of cheeses selected, 45 additional experiments were performed using five different cheese types including soft

Table 2 Enrichment broths tested on 'Camembert' type and semi-hard uncooked cheeses

	Concentration of the antibiotics added to the broth
BPW + cefixim (C)	0.05 mg l ⁻¹ (NF EN ISO 16654)
BPW + tellurite (T)	2.5 mg l ⁻¹ (NF EN ISO 16654)
BPW + CT	0.05 mg l ⁻¹ of cefixim and 2.5 mg l ⁻¹ of tellurite (NF EN ISO 16654)
BPW + vancomycin	8 mg l ⁻¹
BPW + acriflavin	10 mg l ⁻¹
BPW + acriflavin + CT	0.05 mg l ⁻¹ of cefixim, 2.5 mg l ⁻¹ of tellurite (NF EN ISO 16654) and 10 mg l ⁻¹ of acriflavin
BPW + acriflavin + tween + CT	0.05 mg l ⁻¹ of cefixim, 2.5 mg l ⁻¹ of tellurite (NF EN ISO 16654) and 10 mg l ⁻¹ of acriflavin
Primary enrichment in mTSB + acriflavin and secondary enrichment in MacConkey + CT	1 ml of primary enrichment poured into 9 ml of secondary enrichment (NF EN ISO 16654)
Primary enrichment in BPW + acriflavin and secondary enrichment in MacConkey + CT	1 ml of primary enrichment poured into 9 ml of secondary enrichment (NF EN ISO 16654)

mTSB, modified tryptone soya broth (bioMérieux); BPW, buffered peptone water.

cheese, uncooked hard cheese, blue mould cheese, 'Camembert' type cheese and semi-hard uncooked cheese.

Aliquots of each enrichment were sampled at 8 and 24 h and tested by both the VIDAS method and the plate enumeration method.

Growth monitoring

To enumerate *E. coli* O26 strains among the abundant raw milk cheese background microflora, the strains were labelled with a green fluorescent protein. These strains were electroporated in the presence of a plasmid vector pGFPuv (ClonTech, Mountain View, USA) encoding ampicillin resistance and a protein (GFP) that fluoresces green when exposed to long-wave UV light, according to the protocol described by Delazari *et al.* (1998). More precisely, the transformation was carried out by setting the electroporation apparatus at 2.5 kV and 25 µF with the pulse controller adjusted to 200 Ω. An electrical pulse of 4.7 ms was applied. Twenty-five nanograms of GFP ampicillin resistance plasmid (pGFP) was added to the microcentrifuge tubes containing the bacterial cells. The plasmid and cells were mixed by pipetting and then transferred into an Invitrogen 0.2-cm cuvette (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). With the cuvette in the sample chamber, a pulse was applied using the indicated apparatus setting. An aliquot of 100 µl of the transformant suspension was spread on brain heart infusion (51009; bioMérieux) agar (M3012; Kalys, Bernin, France) (BA) plates containing 150 µg ampicillin per ml (Ampicillin Sodium Salt, eu0400; Euromedex, Souffelweyersheim, France) (BA-A). The resulting ampicillin-resistant transformed colonies showed bright green fluorescent colour

when viewed with a handheld UV light (Herolab, Wiesloch, Germany).

After overnight incubation of test sample, the number of viable *E. coli* O26 strains was determined by plating 100 µl of the appropriate dilutions onto PCA (Plate Count Agar) with ampicillin (50 µg ml⁻¹). Counts of background microflora were determined by plating 50 µl of the appropriate dilutions of the samples onto plate count agar (with a spiral plater WASP; AES Chemunex, Cranbury, USA). Strains were enumerated under ultraviolet illumination after 24-h incubation at 37°C.

Detection

Escherichia coli O26 detection by the VIDAS system. The VIDAS *E. coli* O26 is an enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) for the detection of *E. coli* O26 antigens using the automated VIDAS instrument. For analysis, 1.0 ml of enrichment broth was transferred to a capped tube, boiled for 5 min, cooled, and 500 µl was used to run the VIDAS *E. coli* O26 assay according to the manufacturer's instructions. The kit positive and negative controls were included in the analysis of each type of cheese. Any sample that exhibited relative fluorescence values of >150 was considered positive according to the manufacturer's instructions.

Results

The presence of *E. coli* O26 strains could not be detected in the two types of cheeses used in the initial experiments after only 8 h of enrichment. The different enumerations and VIDAS results after 24-h enrichment are shown in Table 3.

Enrichment broths	'Camembert' cheese type			Semi hard uncooked cheese		
	Count of <i>E. coli</i> O26 CFU ml ⁻¹	Standard deviation	VIDAS result (+/-)	Count of <i>E. coli</i> O26 CFU ml ⁻¹	Standard deviation	VIDAS result (+/-)
BPW						
Strain 1	17 460	28 175	(2/1)	>50 000	-	(2/1)
Strain 2	16 773	28 746	(3/0)	>50 000	-	(2/1)
Strain 3	16 667	28 810	(3/0)	>50 000	-	(3/0)
BPW + CT						
Strain 1	14 970	1466	(3/0)	32 703	725	(3/0)
Strain 2	23 732	987	(3/0)	36 239	405	(3/0)
Strain 3	36 304	531	(3/0)	30 878	876	(3/0)
BPW + cefixim						
Strain 1	<100	-	(0/3)	>50 000	-	(3/0)
Strain 2	<100	-	(0/3)	>50 000	-	(3/0)
Strain 3	<100	-	(0/3)	>50 000	-	(3/0)
BPW + tellurite						
Strain 1	12 420	28 839	(1/2)	737	1075	(0/3)
Strain 2	<100	-	(0/3)	33 733	28 175	(3/0)
Strain 3	<100	-	(0/3)	3	52	(0/3)
BPW + vancomycin						
Strain 1	>50 000	-	(3/0)	1523	2581	(0/3)
Strain 2	>50 000	-	(3/0)	62 933	2621	(3/0)
Strain 3	783	1299	(0/3)	<100	-	(0/3)
BPW + acriflavin						
Strain 1	150 000	202 320	(3/0)	15 500	2750	(3/0)
Strain 2	12 451	11 606	(1/2)	2483	1539	(1/2)
Strain 3	16 333	7767	(1/2)	897	1268	(1/2)
BPW + acriflavin + CT						
Strain 1	12 418	2290	(3/0)	>50 000	-	(3/0)
Strain 2	10 203	8393	(3/0)	>50 000	-	(3/0)
Strain 3	8241	8171	(3/0)	>50 000	-	(3/0)
BPW + acriflavin + tween + CT						
Strain 1	<100	-	(0/3)	14 000	9224	(2/1)
Strain 2	<100	-	(0/3)	16 000	9536	(3/0)
Strain 3	<100	-	(0/3)	3000	1309	(0/3)
Mtsb + acriflavin → Mc Conkey + CT						
Strain 1	50	23	(0/3)	<100	-	(0/3)
Strain 2	9250	2385	(3/0)	<100	-	(0/3)
Strain 3	1950	1140	(0/3)	<100	-	(0/3)
BPW + acriflavin → Mc Conkey + CT						
Strain 1	<100	-	(0/3)	<100	-	(0/3)
Strain 2	<100	-	(0/3)	<100	-	(0/3)
Strain 3	<100	-	(0/3)	<100	-	(0/3)

→, transferred; (3/0), 3 test results were positive/0 test result was negative; Count, average for the triplicate samples; BPW, buffered peptone water.

Table 3 *Escherichia coli* O26 counts and VIDAS *E. coli* O26 results with the ten enrichment broths for the two types of cheeses tested after 24-h enrichment

The use of unsupplemented BPW did not allow *E. coli* O26 detection in 3 of 18 tests. *E. coli* O26 counts in these samples were below the detection limit of the VIDAS test: 10⁴ CFU ml⁻¹ of broth.

BPW complemented with cefixim allowed detection of the three strains tested in semi-hard uncooked cheese but not in 'Camembert' cheese type.

In BPW complemented with either tellurite, vancomycin, acriflavin or acriflavin-tween-CT (Cefixime Tellurite),

only one or two strains of *E. coli* O26 was detected by the VIDAS system after 24 h of enrichment in the two matrices.

Addition of cefixim-tellurite or cefixim-tellurite and acriflavin allowed *E. coli* O26 detection by the VIDAS system, with the counts of *E. coli* O26 reaching more than 10⁴ CFU ml⁻¹.

Two protocols using a primary and secondary enrichment step were also tested: primary enrichment in modified tryptone soy broth (mTSB) plus acriflavin or BPW

plus acriflavin and secondary enrichment in MacConkey plus CT. The former allowed the detection of all triplicates of one of the *E. coli* O26 strains, but no other positive VIDAS reactions were observed.

In the second part of the study, the chosen enrichment protocol (BPW + CT + acriflavin) was applied in the enrichment of O26 for a range of cheese types (Table 4).

Escherichia coli O26 counts increased between 8 and 24 h of incubation. After eight hours, all strain test samples were detected in two of five cheese types examined. In 'Camembert' cheese type, none of the strains were detected, and in uncooked hard cheese and blue mould cheese, two of three strains were detected.

After 24-h enrichment, all experimentally inoculated strains were detected by the VIDAS assay except for 'Camembert' cheese type where the three strains tested were not all detected in the three repetitions. The enrichment applied allowed *E. coli* O26 numbers to reach level above 10^4 CFU ml⁻¹, the VIDAS' limit of detection.

Discussion

Two types of cheeses were initially chosen ('Camembert' type cheese and semi-hard uncooked cheese) to preselect

Table 4 *Escherichia coli* O26 counts and VIDAS *E. coli* O26 detection results after 8 and 24 h of enrichment (BPW + CT + acriflavin) in various cheese types

Incubation times	8 h		24 h	
	Count of <i>E. coli</i> O26 CFU ml ⁻¹	VIDAS result (+/-)	Count of <i>E. coli</i> O26 CFU ml ⁻¹	VIDAS result (+/-)
Soft cheese type				
Strain 1	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Strain 2	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Strain 3	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Uncooked hard cheese				
Strain 1	3352	(2/1)	>50 000	(3/0)
Strain 2	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Strain 3	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Blue mould cheese				
Strain 1	3350	(2/1)	>50 000	(3/0)
Strain 2	>5000	(3/0)	33 667	(3/0)
Strain 3	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
'Camembert' cheese type				
Strain 1	<10	(0/3)	16 667	(2/1)
Strain 2	<10	(0/3)	>50 000	(3/0)
Strain 3	<10	(0/3)	33 333	(2/1)
Semi-hard uncooked cheese				
Strain 1	>5000	(3/0)	37 433	(3/0)
Strain 2	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)
Strain 3	>5000	(3/0)	>50 000	(3/0)

(3/0), 3 test results were positive/0 test result was negative; Count, average for the triplicate samples; BPW, buffered peptone water.

an optimal enrichment protocol before the immunological detection of *E. coli* O26 by VIDAS. A total of ten single enrichment media formulations and two other protocols that included a secondary enrichment step were used. The broths chosen were based on recommended formulations for the analysis of dairy products in the VIDAS *E. coli* O157 detection methods. Catarama *et al.* (2003) found that optimum enrichment media for *E. coli* O26 was tryptone soya broth supplemented with cefixim, vancomycin and potassium tellurite, whereas Hara-Kudo *et al.* (2000) found that modified *E. coli* broth with novobiocin was the most effective. Drysdale *et al.* (2004) showed that BPW enrichments gave increased recoveries of *E. coli* O26 strains compared with tryptone soya and EC (*E. coli*) broths. This last study justifies the use of BPW as the basal medium in the majority of the tested broths used in this experimentation.

All enrichment broths were tested at an incubation temperature of 41.5°C. This temperature has been shown to give better detection of *E. coli* O26 in foods (Hara-Kudo *et al.* 2000). Moreover, preliminary studies led in our laboratory showed that this temperature was optimal for the growth of *E. coli* O26 and O157:H7 (data not shown).

In previous studies carried out in our laboratory, no difference in behaviour was noted between the transformed *E. coli* O26 strains and their parental strains: the same decline kinetics of the transformed and parental strains was observed by using the MPN (Most Probable Number) PCR *stx* method (Fremaux *et al.* 2006; Vimont *et al.* 2007) in different matrices. Moreover, these last authors also showed the stability of the GFP plasmid under selective and nonselective conditions.

VIDAS results and *E. coli* O26 counts revealed that BPW + CT and BPW + CT + acriflavin (Table 3) were the two most appropriate enrichment broths for the growth of the three *E. coli* O26 strains used in this study. Indeed, in these media, *E. coli* O26 reached concentrations greater than 10^4 CFU ml⁻¹ after 24 h of incubation despite the presence of significant background microflora. However, the addition of cefixim-tellurite and acriflavin seems to be more adapted for this type of product in which the background microflora can be very important. Selective agents commonly used for STEC detection in food include novobiocin against Gram-negative or acriflavin that inhibit the growth of Gram-positive organisms and cefixim that suppress the growth of *Aeromonas* spp. and *Proteus* spp. (Weaver *et al.* 1996). Moreover, our study showed that *E. coli* O26 strains were resistant to tellurite and acriflavin, a property that has been already described by Hiramatsu *et al.* (2002) who revealed that the great majority of STEC O26 strains (96.8%) showed very high resistance to potassium tellurite. Orth *et al.* (2007) have shown that tellurite resis-

tance in STEC O157:H7 is encoded by the *ter* gene cluster, which consists of the seven genes *terZ*, *terA*, *terB*, *terC*, *terD*, *terE* and *terF* and which is commonly present in clinical STEC O157:H7 isolates. Several studies have investigated the presence and expression of the *ter* genes in non-O157 STEC in a number of serogroups such as O26 and O111 (Orth et al. 2007). In the same way, Hiramatsu et al. (2002) described the suppression of the growth of *Proteus* spp. by cefixim without any impact on the growth of STEC O26.

BPW broth supplemented with cefixim–tellurite and acriflavin was chosen to study other types of raw milk cheeses artificially inoculated with *E. coli* O26. The results demonstrate that the enrichment broth (BPW + CT + acriflavin) enabled the growth of *E. coli* O26 to detection levels by the ELFA assay in five experimentally inoculated types of cheeses, although the detection was limited for two of the test strains in one of the test cheeses. *Escherichia coli* O26 counts reached at least 5×10^4 CFU ml⁻¹ after 24 h of incubation at 41.5°C in the majority of test samples for the variety of cheeses tested in this enrichment, despite the low inoculum level (1–10 CFU per 25 g). The broth supplemented with acriflavin was selected because the addition of this component is recommended by standard ISO 16654 for *E. coli* O157:H7 detection in dairy products. Accordingly, this enrichment broth could be used to detect both *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O26.

To manage the *E. coli* O26 public health problem, different control strategies can be implemented to assure food safety. Thus, rapid, reliable and sensitive procedures of detection must be available to test foods and more particularly French raw milk cheeses. Such procedures include different steps: enrichment, detection, isolation and confirmation. Our study highlighted the fact that BPW + CT + acriflavin is an efficient enrichment broth that allowed selective growth of *E. coli* O26 to a detectable level even among the large background microflora of French raw milk cheeses. What is more, our study has shown that the detection step can be assured by the automated VIDAS system that is able to detect *E. coli* O26 in the enrichment applied.

The protocol developed to detect *E. coli* O26 in raw milk cheeses is very efficient and easy to use in routine diagnostic procedures with the added benefit that it could be available to the cheese industry as a bivalent detection approach permitting *E. coli* O26 and O157 detection from the same enrichment. Indeed, numerous studies have shown that *E. coli* O157:H7 strains could grow on cefixim–tellurite-supplemented media (Vimont et al. 2007). More precisely, a method approved by the 'Association Française de Normalisation' AFNOR recommends a mTSB containing acriflavin and a Mc Conkey broth containing cefixim and potassium tellurite for the enrichment of *E. coli* O157:H7 (bio 12:08-O7/00).

At least, in France, the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) recommendations for pathogenic STEC strains indicate that the presence of three other serogroups is also to be investigated in foods. Considerable further development is required to detect all *E. coli* O103, O111 and O145 in raw milk products. Specific research is still required to optimize enrichment of these other serogroups before their routine detection can be achieved.

Acknowledgements

This work was supported by funds from CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière).

References

- Blackburn, C.W. and McCarthy, J.D. (2000) Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int J Food Microbiol* **55**, 285–290.
- Carroll, A.M., Gibson, A. and McNamara, E.B. (2005) Laboratory based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002–2004. *J Med Microbiol* **54**, 1163–1169.
- Catarama, T.M.G., O'Hanlon, K.A., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2003) Optimisation of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *J Appl Microbiol* **95**, 949–957.
- De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, O., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D. et al. (2008) Outbreak of verocytotoxin producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice-cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance*, **13**, 804.
- Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H., Cliver, D.O. and Jothikumar, N. (1998) Removal of *Escherichia coli* O157:H7 from surface tissues of beef carcasses inoculated with wet and dry manure. *J Food Prot* **61**, 1265–1268.
- Dobson, R. (2006) Report on *E. coli* outbreak recommends a review of guidance. *Br Med J* **332**, 72.
- Drysdale, M., MacRae, M., Stratchen, N.J., Reid, T.M. and Ogden, L.D. (2004) The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J Appl Microbiol* **97**, 220–224.
- Espie, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., de Valk, H. and Vemozy-Rozand, C. (2006) Shigatoxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France 2005. In 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) Dissemination and persistence of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol* **117**, 180–191.

- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Cheasty, T. and Willshaw, G.A. (2005) Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales 1992–2002: where are the risks? *Epidemiol Infect* **133**, 803–808.
- Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Nakagawa, H. and Kumagai, S. (2000) *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Lett Appl Microbiol* **30**, 151–154.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M. and Miyazaki, Y. (2002) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol* **40**, 922–925.
- Hiruta, N., Murase, T. and Okamura, N. (2001) An outbreak of diarrhoea due to multiple antimicrobial resistant shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in a nursery. *Epidemiol Infect* **127**, 221–227.
- Hussein, H.S. and Sukuma, T. (2005) Prevalence of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* **88**, 450–465.
- Liptakova, A., Seigfried, L., Kmetova, M., Birosova, E., Kotulova, D., Bencatova, A., Kosecka, M. and Banovcin, P. (2005) Hemolytic uremic syndrome caused by Verotoxin producing *Escherichia coli* O26. Case report. *Folia Microbiol* **50**, 95–98.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K. and Mc Lauchlin, J. (2008) Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Int J Food Microbiol* **25**, 304–312.
- McMaster, C., Roche, E.A., Willshaw, G.A., Doherty, A., Kinnear, W. and Cheasty, T. (2001) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 outbreak in an Irish creche. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 430–432.
- Montel, M.C. (2004) Bienvenue chez Microflore. Texte document pour la classe (TDC). *Janv Ens* **870**, 14–17.
- Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. and Majid, F. (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* **111**, 181–187.
- Murphy, M., Carroll, A., Whyte, P., O'Mahony, M., Anderson, W., McNamara, E. and Fanning, S. (2005) Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O26 and O111 in retail minced beef in Ireland. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 357–360.
- Nielsen, M.E. and Andersen, M.T. (2003) Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**, 2884–2893.
- Orth, D., Grif, K., Dierich, M.P. and Wurzner, R. (2007) Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Res Microbiol* **158**, 105–111.
- Pearce, M.C., Evans, J., McKendrick, I.J., Smith, A.W., Knight, H.I., Mellor, D.J., Woolhouse, M.E.J., Gun, G.J. et al. (2006) Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroup O26, O103, O111 and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7 associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* **18**, 185–192.
- Pritchard, G.C., Willshaw, G.A., Bailey, J.R., Carson, T. and Cheasty, T. (2000) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal study. *Vet Rec* **147**, 259–264.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S. et al. (1983) Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Eng J Med* **308**, 681–685.
- Sayers, G., McCarthy, T., O'Connell, M., O'Leary, M., O'Brien, D., Cafferkey, M. and McNamara, E. (2006) Haemolytic uraemic syndrome associated with interfamilial spread of *E. coli* O26:H11. *Epidemiol Infect* **134**, 724–728.
- Steele, M.L., McNab, W.B., Poppe, C., Griffiths, M.W., Chen, S., Degrandis, S.A., Fruhner, L.C., Larkin, C.A. et al. (1997) Survey of Ontario bulk raw milk for food-borne pathogens. *J Food Prot* **60**, 1341–1346.
- Upton, P. and Coia, J.E. (1994) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* **344**, 1015.
- Vimont, A., Vernozzy-Rozand, C., Montet, M.P., Bavai, C., Fremaux, B. and Delignette-Muller, M.L. (2007) Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Vet Microbiol* **123**, 274–281.
- Weaver, J.W., Kilpatrick, D.J. and McNamara, A.M. (1996) Evaluation of recovery protocols for heat-stressed enterovirulent *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **13**, 257–263.
- Weber, D., Fruth, A., Liesegang, A., Littmann, M., Buchholz, U., Prager, R., Karch, H., Breuer, T. et al. (2002) A multi-state outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J Infect Dis* **186**, 419–422.

4. Conclusion

Les objectifs de cette étude étaient l'optimisation de l'étape d'enrichissement des *E. coli* O26 dans les produits laitiers et l'évaluation de la sensibilité du VIDAS pour la détection des *E. coli* O26.

La première partie de l'étude a montré que deux bouillons d'enrichissements (EPT + acriflavine et EPT + acriflavine + Céfixime-Tellurite) avaient permis la détection des *E. coli* O26 expérimentalement ensemencées après 24 h d'incubation aussi bien dans le Camembert que dans le Reblochon. Ces deux bouillons ont alors été testés sur d'autres matrices fromagères.

Le bouillon EPT + Céfixime-Tellurite + acriflavine est alors apparu comme le plus efficace: Après un enrichissement de 24 heures, les *E. coli* O26 expérimentalement ensemencés avaient atteint le taux de 10^4 UFC/mL dans les bouillons. Il permettait ainsi la détection des souches cibles dans tous les fromages testés avec le test VIDAS EES. Il est important de souligner également que les performances de ce test VIDAS sont intéressantes puisque nos matrices avaient été ensemencées à un niveau bas (1-10 UFC/25g).

Cette étude a donc permis d'améliorer deux étapes du protocole de recherche des *E. coli* O26, l'enrichissement des fromages au lait cru ainsi qu'une détection automatisée du sérotype O26. Ces données pourraient ainsi être utilisées en routine par les industriels du lait du fait de sa simplicité de mise en œuvre (un enrichissement de 24 heures et un test de détection automatisée).

Toutefois, des études complémentaires pourraient être mises en œuvre sur un plus grand nombre de matrices au lait cru afin d'évaluer et de s'assurer de l'efficacité de cet enrichissement, mais aussi sur des matrices au lait pasteurisé. En effet, des analyses sur de telles matrices pourraient être réalisées par les industriels afin d'éliminer tout danger lié à une contamination croisée de leurs produits. D'autres études pourraient également être menées afin de réduire la durée d'incubation de l'enrichissement qui est à l'heure actuelle de 24 heures. Les produits au lait cru étant soumis à davantage de réglementations que les produits à base de lait pasteurisé par exemple, les industriels sont très demandeurs de méthodes fiables et faciles à mettre en œuvre leur permettant de libérer leur lot tout en s'assurant que leurs produits sont sains.

Enfin, il est indispensable de rappeler que le test VIDAS EES permet de détecter concomitamment *E. coli* O157 et O26. Au cours de cette étude, seule, la détection de *E. coli*

O26 a été évaluée. Par conséquent, il sera indispensable d'une part de vérifier le comportement des *E. coli* O157 dans l'enrichissement, et d'autre part de s'assurer que le seuil de détection de *E. coli* O157 par le VIDAS EES est équivalent.

Notons également, qu'après cette étape de détection, la dernière étape du protocole reste encore à être élaborée : il s'agit de la confirmation par isolement des souches. Sur ce point, des études complémentaires doivent être menées dans la mesure où il n'existe pas à l'heure actuelle de milieu gélosé spécifique à *E. coli* O26. Les laboratoires doivent donc réaliser des PCR pour identifier des colonies. Cependant, ces expérimentations nécessitent du temps, des compétences particulières et une certaine technicité.

CHAPITRE 3 : Evaluation des performances du VIDAS ECPT UP pour la recherche des *E. coli* O157 dans la viande de boeuf

1. Introduction

E. coli O157 est le sérotype le plus impliqué dans les cas d'infections humaines graves à STEC avec notamment l'apparition de SHU. De nombreuses études ont montré que les bovins, de par leur portage sain, constituent le réservoir le plus important de STEC. C'est pourquoi les organismes officiels comme l'AFSSA et l'EFSA (European Food Safety Authority) recommandent de le rechercher de manière systématique dans les denrées à risque telles que la viande de bœuf (avis AFSSA du 11 janvier 2010 et « the EFSA journal, adopted on 18 October 2007 »).

De fait, les industriels de la filière viande hachée notamment mettent en œuvre des analyses sur les produits qu'ils fabriquent (viande hachée fraîche, congelée, assaisonnée...). La mise en œuvre de ces analyses peut mettre de 9h à plus de 24 à 48h selon le protocole de détection employé et les modalités de travail des laboratoires effectuant les analyses. Il est également important de noter que lorsque l'analyse est présumée positive, la confirmation du résultat et la recherche des facteurs de virulence sont réalisés par le Laboratoire National de Référence. L'acheminement des échantillons et ces analyses complémentaires prennent ainsi beaucoup plus de temps. Les industriels possèdent une marge de manœuvre lorsque les analyses sont effectuées sur des produits dont les DLC (Dates Limites de Consommation) sont longues comme pour la viande congelée : ils peuvent attendre les résultats des analyses avant de libérer leur lot. Pour les autres produits comme les viandes fraîches conservées sous-atmosphère, sous-vide, mais surtout celles conservées sans atmosphère protectrice, la mise en place de telles analyses devient une véritable course contre la montre. En effet, pour les steaks hachés frais, les analyses sont souvent « libératoires » : cela signifie que les lots fabriqués ne sont libérés que lorsque le résultat de l'analyse bactériologique est connu.

Il apparaît donc absolument indispensable pour les industriels de réduire le temps de ces analyses et d'avoir à disposition des protocoles de détection permettant d'obtenir des résultats dans la journée afin de libérer leurs lots rapidement (lorsque l'analyse est négative) tout en s'assurant de l'absence de risque pour le consommateur. Notons que dans certains cas, ce

délai d'analyse oblige les industriels et les grandes enseignes à faire des retraits rappels de produits contaminés ou potentiellement contaminés, générant ainsi une mauvaise image auprès des consommateurs.

Par ailleurs, les méthodes de détection des *E. coli* O157 validées et appliquées en France, le sont pour une prise d'essai de 25g. Cette prise d'essai sur un lot permet d'éliminer le risque épidémique d'infection à STEC (30 analyses de 25g doivent être positives pour représenter un tel risque). Néanmoins, les quantités de viande circulant sur le marché sont telles qu'il serait intéressant que ces méthodes permettent de tester des pools d'échantillons de 375g. Ainsi, pour un coût d'analyse identique, l'industriel pourrait évaluer une plus grosse partie de sa production et ainsi limiter d'avantage le risque de cas sporadiques d'infection.

2. Résumé

Escherichia coli O157:H7 est un important agent pathogène associé à des infections le plus souvent causées par la consommation de viande hachée de boeuf crue ou insuffisamment cuite. La mise en place de méthodes de détection de cette bactérie, rapides et sensibles, est donc essentielle pour les industriels de la filière pour qu'ils puissent assurer la qualité de leurs produits.

Il existe différentes méthodes commercialisées, à la disposition des industriels permettant la détection des *E. coli* O157:H7 : des méthodes immunologiques, génétiques, colorimétriques... Toutefois, certaines de ces méthodes sont longues, fastidieuses, coûteuses. Les sensibilités de trois de ces méthodes de détection de *E. coli* O157:H7 ont été comparées : celle du VIDAS ECPT UP, celle d'une méthode non-commerciale de RT-PCR et celle de la méthode de référence (IMS) pour la recherche des *E. coli* O157:H7 dans la viande de boeuf crue. La durée optimale d'enrichissement a également été évaluée ainsi que l'impact de la taille de la prise d'essai avec des échantillons de 25 et 375g (une prise d'essai de 25g étant celle qui est recommandée dans la plupart des méthodes validées). Nous nous sommes également intéressés au ratio prise d'essai/volume de bouillon pour la prise d'essai de 375g (dilution 1/4 et 1/10^{ème}) afin d'évaluer l'impact de la microflore annexe sur l'enrichissement et la détection des souches expérimentalement ensemencées. Quatre types de viande de bœuf ont été testés et ensemencés à faible niveau (1-5 UFC/25 ou 375g) : le minerai (matière première des préparations de viande de bœuf hachées), la viande hachée fraîche, la viande hachée sous-vide, la viande hachée sous-atmosphère, ces trois modes de conditionnement étant les plus répandus dans la filière viande.

Les résultats ont montré que pour un échantillon de 25g, un enrichissement de 6h est suffisant pour détecter *E. coli* O157 :H7 aussi bien avec la méthode VIDAS qu'avec la RT-PCR. En revanche, pour un échantillon de 375g, un enrichissement de 24h est nécessaire. Concernant la méthode de référence, ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec les deux autres méthodes après un enrichissement de 24h.

La méthode VIDAS apparaît être un outil rapide et simple d'utilisation pour la détection des *E. coli* O157 :H7 présents initialement à un faible niveau. De plus, le VIDAS et la RT-PCR permettent l'analyse d'échantillons composites de 375g, ce qui représente un avantage économique pour les industriels et leur permettra de diffuser plus rapidement leur marchandise et donc d'améliorer la gestion du risque pathogène

3. Publication n°2

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans « Journal of Food Protection » en Janvier dernier et de quatre posters présentés à l'ASM (American Society for Microbiology) en juin 2008 à Boston (annexe 5), à l'IAFP (International Association for Food Protection) en mai 2008 à Columbus (annexe 6 et 7) et au congrès VTEC (Vero Toxin *Escherichia Coli*) en mai 2009 à Buenos aires (annexe 8).

Comparative Evaluation of a Phage Protein Ligand Assay with Real-Time PCR and a Reference Method for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Ground Beef and Trimmings

F. SAVOYE,¹* P. FENG,² C. ROZAND,¹ M. BOUVIER,¹ A. GLEIZAL,¹ AND D. THEVENOT¹

¹Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Vetagro Sup Lyon, 1 av Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile, France; and ²U.S. Food and Drug Administration, Division of Microbiology, 5100 Paint Branch Parkway, College Park, Maryland 20740-3835, USA

MS 10-271: Received 28 June 2010/Accepted 2 October 2010

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is an important pathogen associated with infections caused by consumption of undercooked raw meat. Sensitive and rapid detection methods for *E. coli* O157:H7 are essential for the meat industry to ensure a safe meat supply. This study was conducted to compare the sensitivity of the VIDAS ultraperformance *E. coli* test (ECPT UP) with a noncommercial real-time (RT) PCR method and the U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) reference method for detecting *E. coli* O157:H7 in raw ground beef. Optimal enrichment times and the efficacy of testing different types of raw meat, either as individual samples (25 g) or as composites (375 g), were examined. For 25-g samples of each type of raw ground beef tested, 6 h of enrichment was sufficient for both the VIDAS ECPT UP and RT-PCR methods, but for 375-g samples, 24 h of enrichment was required. Both the VIDAS ECPT UP and RT-PCR methods produced results similar to those obtained with the USDA-FSIS reference method after 18 to 24 h of enrichment. The primer specificity of the RT-PCR assay and the highly specific phage ligand used in the VIDAS ECPT UP for target recognition enabled the detection of low levels of *E. coli* O157:H7 in 25 g of various types of raw ground beef. The tests also allowed the detection of *E. coli* O157:H7 in composite raw ground beef and trimmings in samples of up to 375 g.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) is an important Shiga toxin-producing *E. coli* associated with foodborne infections. *E. coli* O157:H7 can cause several disease syndromes, ranging from mild diarrhea to hemorrhagic colitis, which can result in severe complications such as hemolytic uremic syndrome or thrombotic thrombocytopenic purpura (15).

Although other *E. coli* serotypes such as O26, O103, O111, and O145 also have been implicated in outbreaks (26), O157:H7 has remained as the prototypic EHEC strain since the early 1980s (8, 19, 28, 30, 37, 40) and continues to account for most of the EHEC infections worldwide (13).

Beef cattle are the primary reservoir of *E. coli* O157:H7 (33), and infected cattle can carry the bacteria in their gastrointestinal tract without any symptoms of disease (7, 17, 29). *E. coli* O157:H7 is excreted in cattle feces; therefore, feces and hides are considered to be the main sources of O157:H7 contamination of carcasses during slaughter and dressing, but primarily during the skinning and the evisceration phase (2, 3, 10). *E. coli* O157:H7 is especially prevalent in minced meat. During the mincing process, where meat from multiple cows is mixed, one

carcass fecally contaminated with *E. coli* O157:H7 may result in contamination of the entire batch of minced meat. *E. coli* O157:H7 also may be harbored in raw beef that is used in the manufacture of other meat products (12), and contamination rates often increase throughout the process (21).

Consumption of raw or undercooked contaminated ground beef continues to be a significant public health risk. Although good manufacturing practices are essential at every stage of the food supply chain, specific and sensitive *E. coli* O157:H7 detection methods also must be applied to protect consumers (33).

Most detection systems for *E. coli* O157:H7 are designed for use with a single 25-g sample in 250 ml total volume of enrichment broth. However, this sample size often is inadequate for the analysis of large quantities of ground beef produced by wholesale meat suppliers unless a large number of samples are tested. Several detection methods for *E. coli* O157:H7 have been validated for use with 25-g samples, including culture, immunological, and genetic methods. Many of these methods are not automated and require lengthy culture enrichment phases and so are not suitable for routine screening procedures. As an example, the U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) reference method for the

* Author for correspondence. Tel: 00 33 4 78 87 26 85; Fax: 00 33 4 78 87 26 69; E-mail: f.savoye@vetagro-sup.fr.

TABLE 1. Characteristics of *E. coli* O157:H7 strains used in this study

Strain	Origin	<i>uidA</i> gene	<i>stx</i> ₁ gene	<i>stx</i> ₂ gene	<i>eae</i> gene	<i>ehx</i> gene
A	Bovine feces	+	-	+	+	+
B	Cattle slaughterhouse environment	+	-	+	+	+
C	Cattle slaughterhouse environment	+	-	-	+	+
D	Environment	+	-	+	+	+
E	Food	+	+	+	+	+

detection of *E. coli* O157:H7 is specific and sensitive but time-consuming, taking approximately 3 days to detect and identify *E. coli* O157:H7 in ground beef (38). Several rapid methods for *E. coli* O157:H7 detection that have been validated by the Association française de Normalisation (AFNOR; La Plaine Saint-Denis, France) are less time-consuming but also less specific. These assays are not very effective for detecting small numbers of the target microorganism in complex foods such as cheeses or raw ground beef, which frequently contain a large and diverse background of microorganisms (24).

Because of the limitations of these methods for the detection of *E. coli* O157:H7 in ground beef, this study was conducted (i) to examine the effects of testing single versus composite samples, which will enable testing of larger quantities of meat, (ii) to determine the optimal enrichment time and sample-to-broth ratios the 25- and 375-g samples, and (iii) to compare the sensitivity of the VIDAS ultraperformance *E. coli* test (ECPT UP; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), which uses a novel recombinant phage ligand for target specificity, with a noncommercial real-time (RT) PCR method and the USDA-FSIS reference method (39), which uses immunomagnetic separation.

MATERIALS AND METHODS

Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Five strains of *E. coli* O157:H7 from our collection were used in this study. These strains (designated A through E) were isolated from various sources during previous studies and characterized by PCR and RT-PCR assays (Table 1). One PCR assay was used to test for the +93 *uidA* base mutation, which is specific for O157:H7 strains (6), and for the O157 *rfb* gene (27). One RT-PCR assay was used to test for *stx*₁ and *stx*₂ genes, which encode Shiga toxins (27), and another RT-PCR assay was used to test for the *eae* gene, which encodes the

intimin adherence protein (23). All strains were maintained and stored at -80°C.

Samples. Both 25- and 375-g samples of each of four types of raw ground beef were tested: fresh raw ground beef, raw ground beef held under a modified atmosphere, raw ground beef held under vacuum, and beef trimmings. The proportion of fat in the meat samples ranged from 5 to 15%.

Inoculation of samples. The five *E. coli* O157:H7 strains were individually cultured in buffered peptone water (BPW; bioMérieux) at 37°C for 18 to 24 h and then serially diluted in tryptone salt broth (bioMérieux). To determine the cell numbers in the initial inoculum, 100- μ l aliquots from 10⁵, 10⁶, and 10⁷ serial dilutions were plated on tryptic soy agar (bioMérieux) and incubated at 37°C for 24 h, and resulting colonies were counted. The five strains were inoculated individually at low levels (1 to 5 CFU per 25- or 375-g sample) in meat samples in triplicate. One sample of each type of meat was not inoculated and was used as a negative control. Samples were homogenized in stomacher bags and then stored overnight at 4°C to cold adapt the strains and to simulate normal storage conditions.

Enrichment protocol. Aliquots of 25 g of inoculated meat were added into 225 ml of BPW preheated at 41.5°C to obtain a sample-to-broth ratio of 1:10. Each sample was stomached for 2 min and incubated at 41.5 \pm 1°C for 4 to 24 h. For 375-g samples, sample-to-broth ratios of 1:4 (1,125 ml) and 1:10 (3,375 ml) were tested. Each sample was prepared as described above and incubated at 41.5°C for 8 to 24 h in BPW (not preheated at 41.5°C) supplemented with 8 mg/liter vancomycin (Sigma, Steinheim, Germany). Inoculated samples also were prepared as described in the USDA-FSIS reference method protocol for each type of meat. All enrichment protocols are described in Figures 1 and 2.

Analysis for optimal enrichment time. For 25-g samples, aliquots of enrichment culture were removed at 4, 6, 8, 10, and 24 h

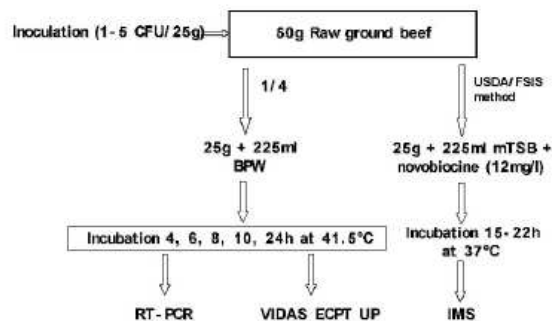


FIGURE 1. Enrichment protocols used for a 25-g sample.

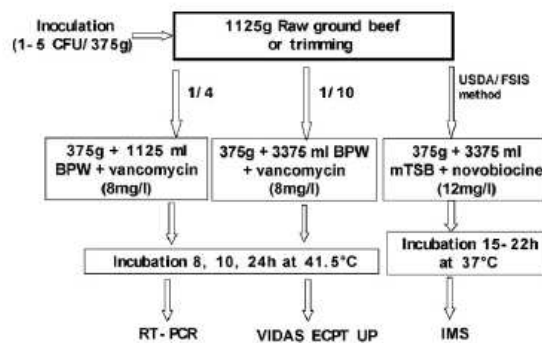


FIGURE 2. Enrichment protocols used for a 375-g sample.

and tested by both the VIDAS ECPT UP and RT-PCR assay. For the composite 375-g samples, aliquots were taken at 8, 10, and 24 h and tested by both methods. For each analysis, 5 to 10 ml of enrichment broth was removed, and 2.0 ml was used for the VIDAS ECPT UP and RT-PCR assay. For the USDA-FSIS method, samples were tested only at 24 h, as described in the protocol.

Analytical methods. The VIDAS ECPT UP is an enzyme-linked fluorescent assay that uses the automated VIDAS or mini-VIDAS instruments, except that this assay has been modified to use a recombinant phage ligand to specifically capture *E. coli* O157. For analysis, 1.0 ml of enrichment broth was transferred to a capped tube, boiled for 5 min, and cooled, and 500 μ l was used to run the VIDAS ECPT UP according to the manufacturer's instructions. Positive and negative controls were included for analysis of each type of uninoculated raw meat. Samples that exhibited relative fluorescence values (RFVs) of >150 were considered positive according to the manufacturer's instructions.

The noncommercial RT-PCR assay was specific for the *rfb* gene that encodes for the O157 antigen (27). Bacterial DNA was extracted from 1 ml of each sample using the Prepman kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and stored at -20°C until use.

Amplification was performed in 25 μ l of reaction mixture containing 11.1 μ l of Master Mix, 5 μ l of template, 3.44 μ l of sterile water, 2.02 μ l of IPC (internal positive control) Mix, 1.25 μ l of each primer *rfbE1* (5'-TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA-3') and *rfbE2* (5'-CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT-3') at 10 pmol/ μ l, 0.5 μ l of the probe *rfbE* (O157) (FAM-AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG-TAMRA) (27), and 0.44 μ l of IPC DNA. All reagents were obtained from Applied Biosystems. Amplification was performed according to the conditions described by Perelle et al. (27). Amplifications were monitored by the increases in fluorescence of the reporter dye at each PCR cycle. The normalized reporter signal (ΔRn , reporter signal minus background) is adjusted by the Applied Biosystems software and then plotted against the number of amplification cycles to determine the threshold cycle (Ct) value. A Ct value is indicative of the PCR cycle number at which fluorescence increased above a defined threshold level, and in this case a Ct of <37 was considered indicative of successful PCR amplification (20).

For comparison, the USDA-FSIS reference method (39), which includes immunomagnetic separation with anti-O157 beads to selectively capture the target, was used for each sample size with a sample-to-broth ratio of 1:10. Each sample was enriched in modified tryptone soya broth (mTSB) supplemented with 12 mg/liter novobiocin (Sigma) and incubated at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 24 h. After immunomagnetic separation, the beads were plated on chromogenic medium (ChromID O157; bioMérieux). Presumptive-positive colonies were tested by latex agglutination with anti-O157 (Oxoid, Basingstoke, UK) and anti-H7 reagents (Remel Microbiology Products, Lenexa, KS).

All detection protocols are included in Figures 1 and 2.

RESULTS

Single samples (25 g). Studies were performed to determine the shortest enrichment time that allowed optimum *E. coli* O157:H7 detection by VIDAS ECPT UP and RT-PCR assay. For 25-g samples, 4 h of enrichment was insufficient; all results were negative with the two methods (Table 2). Fresh raw ground beef inoculated with strain A and sampled at 4 h had a Ct of 39.35 and an RFV of

5, both negative results. However, 6 h of enrichment in BPW at 41.5°C appeared sufficient for each type of raw ground beef tested. Fresh raw ground beef inoculated with strain D yielded a Ct of 30.91 and an RFV of 2,393 after only 6 h of enrichment (Table 2). The USDA-FSIS reference method gave similar results after enrichment in mTSB with novobiocin for 24 h (Table 2).

Composite samples (375 g). For 375-g samples of fresh raw ground beef with a sample-to-broth ratio of 1:4, 10 h of enrichment was sufficient to yield positive results (Table 3). For example, samples inoculated with strain C had a Ct of 30.56 and an RFV of 3,959. However, for samples with a sample-to-broth ratio of 1:10, 10 h of enrichment was not sufficient, yielding a Ct of 40.00 and an RFV of 23. Therefore, 24 h of enrichment was needed to obtain all positive results (Table 3).

No effect of sample-to-broth ratio was found for beef trimming (375-g samples only); all samples except those inoculated with strain D yielded positive results after 10 h of enrichment (Table 3). Strain D samples gave negative results at 10 h with a Ct of 37.25 and an RFV of 68 for the 1:4 ratio and a Ct of 32.19 and an RFV of 48 for the 1:10 ratio; 24 h of enrichment was required to obtain all positive results for samples inoculated with this strain.

For raw ground beef held under modified atmosphere (375-g samples), 10 h of enrichment was sufficient for both methods to detect *E. coli* O157:H7 in all samples with a sample-to-broth ratio of 1:10. However, at a sample-to-broth ratio of 1:4, strain B was not detected after 10 h of enrichment, with a Ct of 34.95 and an RFV of 132 (Table 3). Hence, strain B samples also needed 24 h of enrichment for both methods to yield positive results (Table 3).

In these analyses, regardless of sample type, sample-to-broth ratio, or the strain used, both the VIDAS ECPT UP and the RT-PCR methods produced positive results after 24 h of enrichment. These results are consistent with those obtained with the USDA-FSIS reference method, which was conducted with samples enriched for 24 h in mTSB with novobiocin at a sample-to-broth ratio of 1:10.

DISCUSSION

The presence of *E. coli* O157:H7 in ground beef and cattle herds continues to present a significant health risk (11). Ground beef is a highly perishable product, and the sensitivity and speed of testing methods for *E. coli* O157:H7 are of great interest to the food industry and would benefit consumers (16). However, testing for *E. coli* O157:H7 in ground beef is complex, and many parameters and variables must be considered. This study was designed to examine the effects of some of these variables: (i) testing of single (25 g) versus composite (375 g) samples of ground beef, (ii) optimal sample enrichment times and ratios of sample to broth for the different sample sizes, and (iii) the use of the VIDAS ECPT UP, RT-PCR assay, and USDA-FSIS reference method (with immunomagnetic separation) in each of these situations to determine their ability to detect low levels of *E. coli* O157:H7 in samples after enrichment.

TABLE 2. *E. coli* O157:H7 detection results for 25-g samples of three types of raw ground beef tested with VIDAS ECPT UP and RT-PCR methods after 4, 6, 8, 10, and 24 h of enrichment^a

Matrix	Method	<i>E. coli</i> detection after enrichment for:																				<i>E. coli</i> detection with USDA-FSIS reference method														
		4 h					6 h					8 h					10 h					24 h					A	B	C	D	E					
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E					
Fresh raw ground beef	VIDAS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ECPT UP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RT-PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raw ground beef under vacuum	VIDAS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ECPT UP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RT-PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raw ground beef under MA	VIDAS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ECPT UP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RT-PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a The five *E. coli* O157:H7 test strains are designated with letters A through E. Each strain was tested in triplicate; +, all three test results were positive; -, at least one of the three test results was negative; MA, modified atmosphere.

TABLE 3. *E. coli* O157:H7 detection results for 375-g samples of three types of raw ground beef tested with VIDAS ECPT UP and RT-PCR methods after 8, 10, and 24 h of enrichment^a

Matrix	Sample:broth ratio	Method	<i>E. coli</i> detection after enrichment for:															<i>E. coli</i> detection with USDA-FSIS reference method														
			8 h					10 h					24 h					A	B	C	D	E										
			A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E										
Fresh raw ground beef	1:4	VIDAS ECPT UP	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		RT-PCR	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1:10	VIDAS ECPT UP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beef trimming	1:4	VIDAS ECPT UP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		RT-PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1:10	VIDAS ECPT UP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raw ground beef under MA	1:4	VIDAS ECPT UP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		RT-PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1:10	VIDAS ECPT UP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a The five *E. coli* O157:H7 test strains are designated with letters A through E. Each strain was tested in triplicate; +, all three test results were positive; -, at least one of the three test results was negative; MA, modified atmosphere.

Artificially contaminated raw ground beef samples were used for these tests. However, because of the low infective dose of *E. coli* O157:H7 and the low levels of contamination naturally present in food, the raw ground beef samples were inoculated at very low levels (1 to 10 CFU per 25 or 375 g) to simulate natural contamination conditions. The enrichment medium and incubation temperature also are critical variables in sample testing. For these studies, BPW was selected because it has been reported to be superior to five other enrichment media (mTSB, modified *E. coli* broth, EHEC broth, and modified BPW) for enhancing the growth of the strains tested and improving sensitivity of detection methods (18, 25). In other studies, the optimal growth temperature for *E. coli* O157:H7 has been determined at around 40°C (14, 23); hence, the incubation temperature used in this study was 41.5°C.

The levels and type of background flora present in a sample can have a major effect on assay efficiency. Vold et al. (41) found that the presence of large numbers of background bacteria in ground meat can inhibit the growth of *E. coli* O157:H7. The background flora in ground beef usually consists of lactic acid bacteria, approximately 80% of which are *Lactobacillus sakei* (41). Manufacturers use different packaging processes such as vacuum or modified atmospheres to limit growth of aerobic microflora for better product conservation. However, different packaging processes can result in differences in the microflora of the packaged meat. For example, lactic acid bacteria in raw ground beef packed under vacuum induces acidification, which limits or prevents the growth of other bacteria (31). However, in samples packaged under a modified atmosphere, after vacuum has been attained a gas that limits bacterial growth is injected, which can affect the levels and proportions of microflora. Other types of background microflora can be present, and some researchers have described antagonistic activity of background microflora against *E. coli* O157:H7 (9, 34, 35, 41). We examined four types of ground beef samples and trimmings packed under different conditions and found no effect due to differences in background microflora. Kinetics studies performed revealed that for 25-g samples and all four types of raw ground beef tested, a 6-h enrichment period in prewarmed BPW at 41.5°C was sufficient for detecting *E. coli* O157:H7 by VIDAS ECPT UP. These results suggest that the enrichment broth and conditions used allowed growth of *E. coli* O157:H7 despite heterogeneity of background microflora in the different sample types.

Most food analysis methods are conducted with standard 25-g samples. However, a composite sampling plan, which combines randomly collected samples into one large composite sample (e.g., 375 g) and tests the entire composite at one time, can provide an economic advantage to the food industry (36). To better meet desired food safety objectives and to allow a more statistically representative sampling protocol, the results obtained for a 375-g composite sample were compared with those obtained for a single 25-g sample.

For 375-g samples, three types of raw ground beef were tested: fresh raw ground beef, raw ground beef under

modified atmosphere, and beef trimmings. Vimont et al. (40) found that *E. coli* O157 growth was inhibited when the level of background microflora in the enrichment broth reached 8.62 to 8.86 log CFU·ml⁻¹. Because the amount of background microflora would be expected to be higher in 375-g samples, vancomycin was added to the BPW to suppress background microflora. Ogden et al. (25) found that BPW supplemented with vancomycin was the optimum enrichment medium for the recovery of *E. coli* O157 in minced beef. However, the use of vancomycin was not sufficient to shorten the enrichment time; variations in recovery among strains were observed after 10 h of enrichment. These results are consistent with those of Baylis (4), who found that the sensitivity of the enrichment conditions can be strain related. As a result, 24 h of enrichment was necessary to detect all the strains in the 375-g samples of different ground beef types. Under these assay conditions, VIDAS ECPT UP successfully detected *E. coli* O157:H7 with high sensitivity, giving results that were similar to those obtained with the RT-PCR assay.

The standard ratio of sample to enrichment broth used in food analysis is 1:10. However, alteration of the 1:10 ratio to 1:4 would result in a significant cost savings in terms of growth medium, would require less incubator space, and would be less cumbersome. Currently, only a few studies have been conducted to examine the impact of the sample-to-broth ratio; therefore, this study was designed to examine the effects of using 1:10 and 1:4 sample-to-broth ratios. Detection results obtained after 10 or 24 h of enrichment revealed no significant difference between the two ratios tested. This result was surprising; the 1:10 ratio was expected to provide more reliable results by providing greater dilution of background microflora, fat molecules, and other assay inhibitors. However, our results confirmed the findings of Bosilevac and Koochmarai (5), who found that the volume of enrichment medium added to beef trim and ground beef did not affect the culture isolation of *E. coli* O157:H7 from the samples. However, enrichment broths were not preheated because their volume was very important compared with the capacity of the incubators. As a consequence, the optimal temperature for *E. coli* growth was reached after a longer time. Our results could be validated by analyzing samples with preheated broth in larger incubators.

Both the VIDAS ECPT UP and the noncommercial RT-PCR method produced results comparable to those obtained with the reference USDA-FSIS method for the detection of *E. coli* O157:H7 in ground beef. The VIDAS ECPT UP uses a novel bacteriophage-derived recombinant receptor to selectively capture the target. Rozand and Feng (32) found that the phage ligand was highly specific for *E. coli* O157 and offered some advantages for the detection of atypical O157:H7 strains. This novel assay has been validated by both AFNOR and the AOAC Research Institute (Gaithersburg, MD). The RT-PCR assay targets the *rfb*_{O157} gene for the O157 antigen (27) and uses primers and TaqMan probes to enable specific detection.

By comparing analysis times and sample handling capacity of the assays, we found that for 25-g samples, the times to results were 7 h, 7 h 50 min, and approximately 48 h

for the VIDAS ECPT UP, the RT-PCR assay, and the USDA-FSIS method, respectively. For 375-g samples, the analysis times increased to 25 h for both the VIDAS ECPT UP and the RT-PCR assay because of the longer enrichment time. However, regardless of sample size, both the VIDAS ECPT UP and RT-PCR assay can perform the analysis automatically within 60 min after enrichment, with a maximum capacity of 30 samples for the VIDAS ECPT UP and 96 samples for the RT-PCR assay in one run. In contrast, the USDA-FSIS reference method requires a 24-h enrichment step and the concentration of 30 samples, which takes about 100 min when using two magnetic particle concentrators, each fitted to handle 6 samples at a time (1). Aminul Islam et al. (1) found that the USDA-FSIS reference method also has a potential risk for cross-contamination during the performance of immunomagnetic separation.

Compared with the USDA-FSIS reference method, both the VIDAS ECPT UP and the RT-PCR assay are less time-consuming and are fully automated and thus less labor intensive. However, the routine use of DNA amplification methods for detecting pathogens in foods continues to provide technical challenges for diagnostic laboratories, including the high costs of reagents, the need for DNA extraction, and the abundance of components in foods that can interfere or inhibit amplification.

In conclusion, the use of VIDAS tests with rapid results (especially for 25-g samples) will be of great benefit for food companies and diagnostic laboratories. In addition, instead of testing 15 individual 25-g samples, testing of a single 375-g composite sample would be easier, would provide an economic advantage to the industry, and would allow a more rapid turnaround time for test results, allowing inventory reduction and reduced warehousing costs for food companies and providing fresher products to consumers.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Pr. J. Guzzo for critically reading the manuscript and making several useful remarks.

REFERENCES

- Aminul Islam, M., A. E. Heuvelink, K. A. Talukder, and E. de Boer. 2006. Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. *Int. J. Food Microbiol.* 109:151–156.
- Aslam, M., F. Natress, G. Greer, C. Yost, C. Gill, and L. McMullen. 2003. Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2794–2799.
- Barkocy-Gallagher, G. A., T. M. Arthur, M. Rivera-Betancourt, X. Nou, S. D. Shackelford, T. L. Wheeler, and M. Koohmaraie. 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J. Food Prot.* 66:1978–1986.
- Baylis, C. L. 2008. Growth of pure cultures of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. *J. Appl. Microbiol.* 105:1259–1265.
- Bosilevac, J. M., and M. M. Koohmaraie. 2008. Effects of using reduced volumes of nonselective enrichment medium in methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from raw beef. *J. Food Prot.* 71:1768–1773.
- Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay–multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:248–250.
- Chapman, P. A., A. T. Cerdan Malo, M. Ellin, R. Ashton, and M. A. Harkin. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.* 64:139–150.
- Dobson, R. 2006. Report on *E. coli* outbreak recommends a review of guidance. *Br. Med. J.* 332:72.
- Duffy, G., R. C. Whiting, and J. J. Sheridan. 1998. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16:299–307.
- Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in faeces, hides and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2999–3003.
- Feldsine, P. T., D. E. Kerr, S. C. Leung, A. H. Lienau, R. F. Moser, and L. A. Mui. 2002. Visual immunoprecipitate assay eight hour method for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in raw and cooked beef (modification of AOAC official method 996.09): collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:5.
- Flores, R. A., and T. E. Stewart. 2004. Empirical distribution models for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef produced by a mid-size commercial grinder. *J. Food Sci.* 69(5):M121–M126.
- Gillespie, I. A., S. J. O'Brien, G. K. Adak, T. Cheasty, and G. A. Willshaw. 2005. Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales 1992–2002: where are the risks? *Epidemiol. Infect.* 133:803–808.
- Gonthier, A., V. Guérin-Faubleé, B. Tilly, and M. L. Delignette-Muller. 2001. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:352–356.
- Gooding, C. M., and P. V. Choudary. 1997. Rapid and sensitive immunomagnetic separation–polymerase chain reaction method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and ice-cream. *J. Dairy Res.* 64:87–93.
- Guerini, M. N., T. M. Arthur, S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie. 2006. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. *J. Food Prot.* 69:1007–1011.
- Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriot, and L. V. Carpenter. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35:11–19.
- Hussein, H. S., and L. M. Bollinger. 2008. Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:227–244.
- Morgan, D., C. P. Newman, D. N. Hutchinson, A. M. Walker, B. Rowe, and F. Majid. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111:181–187.
- Murphy, M., A. Carroll, C. Walsh, P. Whyte, M. O'Mahony, W. Anderson, E. McNamara, and S. Fanning. 2007. Development and assessment of a rapid method to detect *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in retail minced beef. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210: 155–161.
- Nastjevic, I., R. Mitrovic, and S. Buncic. 2009. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Sci.* doi:10.1016/j.meatsci.2008.12.007.
- Nauta, M. J., and J. Dufrenne. 1999. Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol.* 1:137–155.
- Nielsen, M. E., and M. T. Andersen. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:2884–2893.
- Oberst, R. D., M. P. Hays, L. K. Bohra, R. K. Phebus, C. T. Yamashiro, C. Paszko-Kolva, J. A. Flood, J. M. Sargeant, and J. R. Gillespie. 1998. PCR-based DNA amplification and presumptive

- detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3389–3396.
25. Ogden, I. D., N. F. Hepburn, and M. McRae. 2001. The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 91:373–379.
 26. Pearce, M. C., J. Evans, I. J. McKendrick, A. W. Smith, H. I. Knight, D. J. Mellor, M. E. J. Woolhouse, G. J. Gun, and J. C. Low. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroup O26, O103, O111 and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:653–659.
 27. Perelle, S., F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* 18:185–192.
 28. Pritchard, G. C., G. A. Willshaw, J. R. Bailey, T. Carson, and T. Cheasty. 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal study. *Vet. Rec.* 147:259–264.
 29. Renter, D. G., J. M. Sargeant, R. D. Oberst, and M. Samadpour. 2003. Diversity, frequency and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:542–547.
 30. Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
 31. Rosset, R., and P. Lameloise. 1989. Conditionnement sous vide (viande, poisson, plats cuisinés). Ministère de l'agriculture, Centre de Documentation Internationale des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles, Association pour la Promotion des Industries Agricoles, Paris.
 32. Rozand, C., and P. C. H. Feng. 2009. Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 72:1078–1081.
 33. Sarimehmetoglu, B., M. H. Aksoy, N. D. Ayaz, Y. Ayaz, O. Kuplulu, and Y. Z. Kaplan. 2009. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control* 20:357–361.
 34. Senne, M. M., and S. E. Gilliland. 2003. Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. *J. Food Prot.* 66:418–425.
 35. Tamplin, M. L. 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *J. Food Prot.* 65:1535–1540.
 36. Tsai, W.-L., C. E. Miller, and E. R. Richter. 2000. Determination of the sensitivity of a rapid *Escherichia coli* O157:H7 assay for testing 375-gram composite samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4149–4151.
 37. Upton, P., and J. E. Coia. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* 344:1015.
 38. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 1994. Microbiological testing program for *E. coli* O157:H7 in raw ground beef. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington, DC.
 39. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2010. Procedure for detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products, chap. 5.04. In Microbiology laboratory guidebook. U.S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service, Washington, DC. Available at: http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/. Accessed 15 November 2010.
 40. Vimont, A., C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, C. Lazizzera, C. Bavaï, and M. L. Delignette-Muller. 2006. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:261–268.
 41. Vold, L., A. Holck, Y. Wasteson, and H. Nissen. 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Int. Food Microbiol.* 56:219–225.

4. Conclusion

La maîtrise du risque lié au pathogène *E. coli* O157:H7 est un problème de santé publique ; plus particulièrement dans le cas de la viande hachée fraîche car il s'agit d'une denrée périssable avec une durée de péremption très courte de l'ordre de quelques jours. Il apparaît donc important de fournir aux industriels de l'agro-alimentaire des outils performants et rapides permettant la détection d'*E. coli* O157:H7 dans la viande hachée et ceci afin d'assurer la sécurité du consommateur.

Le but de cette étude était donc l'évaluation des performances de deux de ces outils, le VIDAS ECPT UP et la RT-PCR, par rapport à la méthode de référence (IMS).

L'analyse d'une prise d'essai de 25g grâce au VIDAS ECPT UP présente l'avantage d'être très rapide. La cinétique effectuée a montré que pour les échantillons de 25g, quelque soit le type de viande de bœuf testé, un enrichissement de 6h en EPT préchauffé à 41.5°C est suffisant pour détecter les *E. coli* O157 :H7 avec le VIDAS ECPT UP. Ces résultats suggèrent que malgré l'hétérogénéité de la microflore présente dans les différents échantillons, les conditions d'enrichissement choisies ont permis une croissance suffisante des *E. coli* O157 :H7 pour leur détection.

Concernant les échantillons de 375g, un enrichissement de 24h en EPT supplémentée en vancomycine a été nécessaire pour permettre la détection des souches de *E. coli* O157 :H7 dans les différents types de viande. Les mêmes résultats ont été obtenus aussi bien avec le VIDAS ECPT UP qu'avec la RT-PCR. Ces deux méthodes ont montré une bonne sensibilité dans la mesure où les échantillons avaient étéensemencés à faible niveau. Pour des raisons économiques et de praticabilité d'analyse, nous avons évalué un ratio échantillon/volume du bouillon de 1/4 pour les analyses des échantillons de 375g. Les résultats obtenus après 10 ou 24 h d'enrichissement n'ont pas mis en évidence de différence entre ces deux ratios contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer. En effet, une dilution au 1/10 aurait pu donner de meilleurs résultats puisque la flore annexe, les molécules de gras ainsi que les autres inhibiteurs présents se trouvent alors plus dilués.

Notons également, que le temps d'enrichissement aurait probablement pu être diminué en préchauffant nos bouillons dans des étuves. Malheureusement, les volumes étaient tels que nous n'avions pas les équipements nécessaires pour le faire. La température optimale de croissance des *E. coli* a donc pris plus de temps pour être atteinte. Il serait intéressant de pouvoir réaliser de nouvelles expérimentations dans le but de confirmer cette supposition.

Cette étude a finalement montré que les deux méthodes évaluées : le VIDAS ECPT UP et la PCR en temps réel ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence (IMS) après 24 h d'enrichissement pour la recherche des *E. coli* O157:H7 dans la viande de bœuf. Toutefois, le VIDAS ECPT UP et la RT-PCR requièrent moins de temps et de main d'œuvre puisqu'elles présentent l'avantage d'être automatisées. Précisons tout de même que malgré leur efficacité, ces automates ont un coût élevé. Concernant la méthode PCR, elle nécessite en plus d'utiliser des techniques d'extraction d'ADN en amont et des réactifs qui s'ajoutent au coût déjà important de l'automate en lui-même. Notons également que l'interprétation des résultats est plus difficile. Les laboratoires de diagnostic doivent donc prendre en compte tous ces paramètres avant de décider quelles méthodes ils utiliseront pour leurs analyses de routine.

CHAPITRE 4 : Mise au point d'un test permettant de concentrer les 5 sérogroupes de *E. coli* majeurs selon l'AFSSA (VIDAS ESPT)

1. Introduction

Nous avons souligné que *E. coli* O157:H7 est identifié comme le chef de file des STEC puisqu'il est à l'origine de nombreuses épidémies. L'EFSA recommande donc aux industriels de l'agro alimentaire d'axer principalement leurs analyses sur ce sérotype. Néanmoins, d'autres épidémies ont été liées à la consommation d'aliments contaminés par des souches de *E. coli* appartenant à d'autres sérotypes. Ainsi, l'AFSSA a défini 5 sérotypes considérés comme pathogènes, et l'EFSA indique que la recherche des STEC pathogènes pourrait être étendue aux sérogroupes O26, O103, O91, O145 et O111.

Un projet de norme du groupe de travail CEN TC275/WG6 a ainsi vu le jour. Il est actuellement soumis à l'ISO pour évaluation. Il s'agit d'une méthode horizontale basée dans un premier temps sur une PCR en temps réel destinée à rechercher les facteurs de virulence *eae* et *stx* puis les gènes codant les antigènes somatiques des 5 sérogroupes O157, O26, O103, O145 et O111 dans les bouillons d'enrichissement des matrices alimentaires. Cette étape est suivie, si les PCR se révèlent positives par une étape de confirmation visant à isoler les souches suspectées d'être présentes. Cette étape emploie une technique difficile à mettre en œuvre par les industriels ou laboratoires de routine : l'IMS. Cette technique qui est lourde, fastidieuse et peut générer des contaminations croisées ne permet un isolement des STEC que séro groupe par séro groupe.

La technique présentée ci-dessous est une méthode automatisée utilisant le VIDAS, et qui permettrait de détecter et d'isoler par concentration des 5 sérogroupes en même temps.

Une étude préalable a été nécessaire afin d'évaluer individuellement les nouvelles protéines de phage que BioMérieux souhaitait utiliser pour la mise au point de son nouveau kit VIDAS.

2. Etude préalable à l'élaboration des cônes 5 sérogroupes

2.1. La technologie : des protéines de phage

Les fabrications de protéines de phage n'ont pas été réalisées au cours des travaux de cette thèse. Certaines étapes sont d'ailleurs restées confidentielles. Cependant, il nous est apparu intéressant de présenter de manière succincte cette technologie.

Les bactériophages sont des virus très spécifiques qui infectent exclusivement les bactéries. Ils ont recours à des structures d'adhérence pour se fixer à leurs bactéries hôtes. Dans le cas du VIDAS ESPT, des protéines de liaison spéciales provenant des bactériophages sont utilisées pour la capture et la détection ciblées de bactéries présentes dans un échantillon (Figure 30). Cette technologie offre une sensibilité et une spécificité de très haut niveau par rapport aux anticorps qui étaient utilisés auparavant.

Les bactériophages font partie des formes de vie les plus abondantes du globe et sont programmés exclusivement pour infecter et identifier les bactéries hôtes. Les phages évoluent avec les bactéries depuis plus d'un milliard d'années et sont capables de survivre dans les environnements les plus extrêmes comme le sol, les déchets d'origine animale ou les intestins. Les travaux de recherche montrent que les phages offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux anticorps, comme une spécificité et un pouvoir de fixation supérieurs, lors de leur utilisation dans les systèmes de tests microbiologiques. Il semblerait que les protéines de phages fournissent des performances robustes dans de nombreuses applications, mêmes lorsqu'elles sont exposées aux matrices alimentaires les plus difficiles et les plus complexes. Il faut savoir que les protéines de phage nous ont été fournies par une société allemande qui travaille en partenariat avec bioMérieux et qui élabore les protéines de phage de la façon suivante :

- ☛ Dépistage et identification des phages spécifiques de l'agent pathogène d'intérêt
- ☛ Séquençage de la protéine
- ☛ Clonage
- ☛ Production et purification de la protéine recombinante
- ☛ Etiquetage de la protéine recombinante.

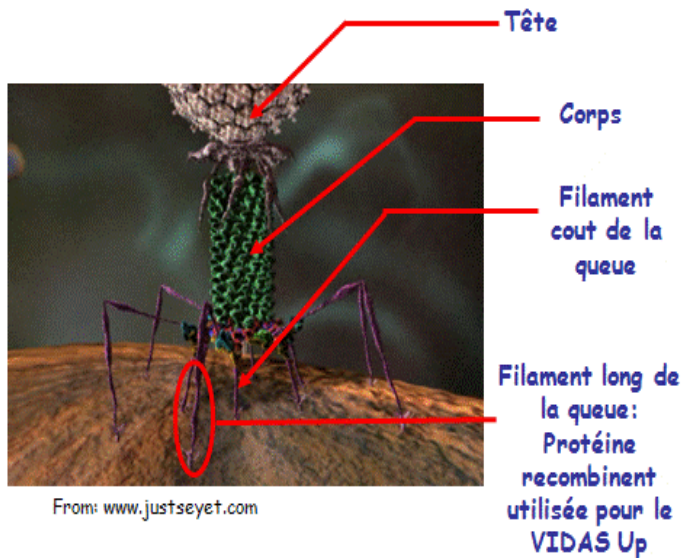


Figure 30 : Les différentes parties d'un bactériophage

2.2. Détermination des concentrations nécessaires dans le cône

- Fabrication des cônes

L'élaboration du cône contenant les protéines de phage ciblant les 5 sérogroupes de *E. coli* s'est fait en plusieurs étapes.

Les performances des protéines de phage de chaque séro groupe ont été évaluées par rapport à celles des anticorps qui étaient précédemment utilisés. Pour se faire des coating ont été réalisés : pour chaque séro groupe, d'une part des séries de cônes contenant les protéines de phage à différentes concentrations, et de l'autre une série de cône contenant l'anticorps à la concentration que l'on connaissait comme optimale ont été fabriquées. Précisons que les cônes étaient coatés avec un seul type de phage ou d'anticorps pour cette première partie.

Un coating se déroule en trois étapes :

- jour 1 : sensibilisation des cônes en BSA-biotinylés
- jour 2 : sensibilisation des cônes en streptavidine dans un premier temps puis en anticorps ou protéines de phage.
- jour 3 : séchage et ensachage des cônes

- Protocole d'évaluation des cônes phage vs anticorps

Ces différents cônes ont ensuite été évalués par nos soins ainsi que ceux de la société bioMérieux. Les travaux ont été réalisés sur des bouillons de souches pures à différentes

concentrations : des souches spécifiques pour évaluer la sensibilité (Figure 31) et des souches non spécifiques pour évaluer la spécificité (Figure 32). Ces souches sont répertoriées dans le tableau en annexe (annexe 3).

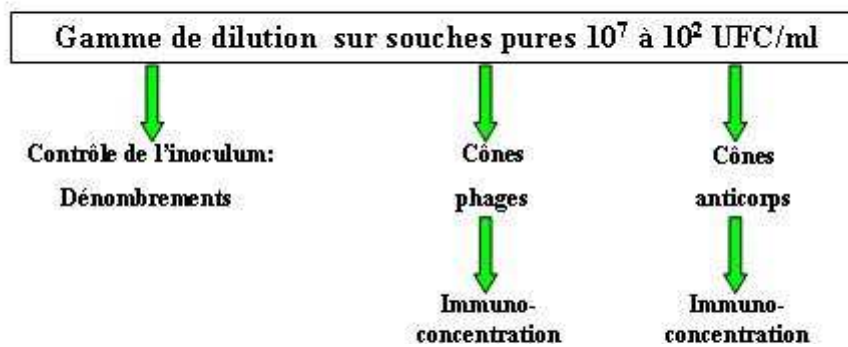


Figure 31 : Protocole d'évaluation de la sensibilité

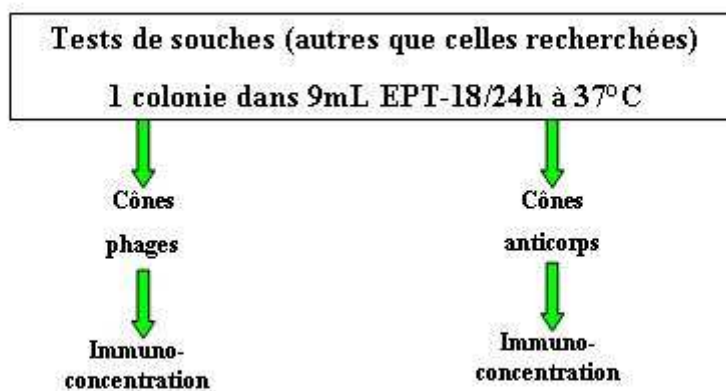


Figure 32 : Protocole d'évaluation de la spécificité

2.3. Performances des cônes coâtés avec les phages par rapport à ceux avec les anticorps et choix des concentrations optimales.

Ces différentes études nous ont permis d'obtenir les résultats suivants :

Tableau 14 : Performances des protéines de phage aux concentrations choisies.

Sérogroupe	O26	O103	O111	O145	O157
[c] optimale choisie (µg/mL)	0.5	0.5	0.4	1.25	0.3
Sensibilité VIDAS (UFC/mL) avec les cônes phages	10 ³	10 ²	10 ²	10 ³	10 ²
Sensibilité VIDAS (UFC/mL) avec les cônes anticorps	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³

La comparaison des deux formats de cône a permis de mettre en évidence que les protéines de phage ont une sensibilité meilleure ou égale à celle des anticorps. De plus, les expériences ont permis de déterminer les concentrations optimales d'utilisation en protéines de phage de chaque séro groupe : de 0.3 à 1.25 µg/ml. A ces concentrations, les limites de détection par concentration des bactéries sont comprises de 10^2 - 10^3 UFC/ml en fonction du séro groupe (Tableau 14).

Concernant la spécificité de ces protéines de phage, elle est assez bonne puisque seulement le *Citrobacter* en petite quantité est apparu sur les géloses et une des souches de *E. coli* non spécifiques testées. Ces résultats se sont répétés pour toutes les protéines de phage testées sauf celles ciblant les *E. coli* O157. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que ces souches étaient extrêmement concentrées ($\geq 10^8$ UFC/mL).

Une fois les concentrations optimales définies et les tests de spécificité terminés, une nouvelle série de cônes coatés avec les 5 types de phage a été fabriquée et évaluée au cours de mes travaux.

3. Evaluation du nouveau test de concentration

3.1. Résumé

Escherichia coli O26, O103, O111, O145 et O157 sont les cinq séro groupes majeurs définis par l'AFSSA comme étant les plus souvent associés aux infections d'origine alimentaire. Les contaminations par les *E. coli* entérohéorragiques (EHEC) sont la première cause d'insuffisance rénale chez l'enfant. A l'origine des épidémies les plus connues, la viande de bœuf hachée peu cuite est le plus souvent incriminée. Il est donc essentiel pour les industriels de la filière d'avoir à leur disposition un protocole de détection efficace des 5 séro groupes de *E. coli* pointés du doigt.

L'objectif de cette étude était l'évaluation d'un nouveau test de concentration automatisé (VIDAS ESPT). L'originalité de ce test repose sur l'utilisation de protéines recombinantes de phage.

Dans un premier temps, la spécificité du cône au format 5 séro groupes a été évaluée sur un panel de 50 bouillons de cultures pures de *E. coli* O26, O103, O111, O145, O157, STEC et non-STECS. La sensibilité des cônes a également été évaluée sur des cultures pures ou non de *E. coli*. Puis ce nouveau test a été employé sur des matrices de viandes bovines

expérimentalement ensemencées avant ou après enrichissement. Durant cette étude, les performances du VIDAS ESPT ont été comparées à celles de l'IMS.

Les dénombrements des solutions concentrées obtenus après un VIDAS ESPT sont comparables à ceux obtenus avec l'IMS. Cependant, les géloses obtenues avec le test VIDAS présentent une concentration moins importante en flore annexe par rapport à celles de l'IMS. Le VIDAS ESPT semblerait avoir une meilleure spécificité que l'IMS.

L'étude sur les gammes de dilution de cultures pures des *E. coli* spécifiques a mis en évidence un seuil de sensibilité du test avoisinant 10^2 - 10^3 UFC/mL. Lorsque la même étude a été faite sur les dilutions de *E. coli* spécifiques réalisées dans des bouillons de souches non spécifiques, le seuil de sensibilité est de 10^2 à 10^4 UFC/mL selon les sérogroupes.

Concernant les évaluations réalisées sur matrices expérimentalement ensemencées, le test s'est révélé être assez sensible pour l'isolement de très faibles niveaux de contamination (1 à 5 UFC/25g). Le VIDAS ESPT s'est de plus révélé avoir des performances semblables ou meilleures à celle de l'IMS lors de l'étude sur les matrices naturellement contaminées.

Le VIDAS ESPT semble être un outil rapide et simple d'utilisation pour la concentration simultanée des *E. coli* appartenant au « gang des 5 » présents initialement à un faible niveau dans les aliments. Utilisé pour la confirmation d'un résultat de détection positif, il facilitera grandement l'isolement et l'identification des souches suspectes. Notons que contrairement à l'IMS, ce test présente l'avantage de pouvoir concentrer les 5 sérogroupes en une fois. Il permet ainsi d'améliorer la gestion du risque pathogène, ce qui représente un avantage évident pour les industriels.

3.2. Publication n°3

Cette étude a fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement dans « Journal of Food Protection » et de deux posters présentés à l'IAFP (International Association for Food Protection) en août 2010 à Anaheim (Californie) (annexe 9) et au congrès Food Micro en Août 2010 à Copenhague (Danemark) (annexe 10).

Novel Phage Concentration Assay for Isolation of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157

F.SAVOYE^a, M. BOUVIER^a, J-L. PITTET^b, D. THEVENOT-SERGENTET^a

^aVetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon, Unité de Microbiologie alimentaire et Prévisionnelle, 1 avenue Bourgelat, 69280, Marcy l'Etoile. France

Tel : 3347882685, Fax: 33478872669, email : f.savoye@vetagro-sup.fr

^bBioMérieux, R&D Industrie, chemin de l'orme, 69280, Marcy l'Etoile. France

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) that cause hemorrhagic diarrhoeal disease and Haemolytic and Uremic Syndrome are associated with some predominant serotypes: O26, O103, O111, O145 and O157. This study was designed to develop and optimize an automated immuno-concentration of *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 with the use of specific recombinant phage proteins for capture. Immuno-concentration specificity was evaluated with 50 pure culture strains (*E. coli* O157, O26, O103, O111, O145, STEC and non-STEC). Sensitivity of the method was determined using meat products enriched in buffered peptone water (BPW) and experimentally inoculated with low number of STEC (10^1 to 10^7 CFU/ml) just prior to applying the immuno-concentration method. The method was then evaluated on food samples artificially contaminated with stressed cells and enriched in BPW for 24 hours at 41.5°C. The inclusivity and exclusivity study clearly showed that the method was highly specific for the targeted strains. The immuno-concentration was shown to be sensitive enough for isolation of very low levels of cold-adapted strains (1 to 5 CFU/25g) in artificially contaminated foods after enrichment.

INTRODUCTION

STEC that cause hemorrhagic diarrhoeal disease and Haemolytic and Uremic Syndrome are associated with some predominant serogroups such as O157, O26, O103, O111 and O145. These serogroups have been referred to as “the gang of five” (Beutin, 2006). Their high

virulence status means that absence of these pathogenic *E. coli* strains must be guaranteed to ensure a safe release of foods. Although *E. coli* O157:H7 has remained as the prototypic EHEC strain since the early 1980s (Dobson, 2006; Morgan *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 2000; Riley *et al.*, 1983; Upton and Coia, 1994; Vimont *et al.*, 2006), other *E. coli* serogroups such as O26, O103, O111 and O145 have also been implicated in outbreaks (Pearce *et al.*, 2006). Only a few food laboratories screen for these non-O157 STEC, mainly because of the absence of a specific International Organisation for Standardisation (ISO) method (ISO 2001). Moreover, non-O157 STEC strains are a heterogeneous group which display a broad range of both genotypic and phenotypic differences (Schmidt *et al.*, 1999; Bettelheim 2000; 2003; 2007).

In the National Reference Laboratory, the detection of non-O157 STEC in foods is carried out using a combination of PCR and DNA probe techniques to detect Shiga toxin genes and other specific base mutations (Willshaw *et al.*, 2001). These tests are not routinely available in laboratories. However, an immuno magnetic separation method using beads coated with antibodies specific to *E. coli* O26, O103, O111 and O145 has been described for the isolation of these serogroups (Jenkins *et al.*, 2003).

This study was designed to develop and optimize an automated immuno-concentration method on the VIDAS system for *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 (VIDAS ESPT) with the use of specific recombinant phage proteins for capture. The aim of the method is to facilitate the isolation of these specific STEC strains from enriched food products.

MATERIALS AND METHODS

This study was designed to demonstrate the feasibility of the immuno-concentration method and to evaluate its sensitivity and specificity. These various parameters were evaluated on pure broth suspensions of the specific STEC strains and on artificially inoculated raw beef samples.

- STEC strains

The strains used (table 1) were isolated from various sources during previous studies and characterized by PCR and RT-PCR. One PCR assay was used to test for the +93 *uidA* base mutation which is specific for O157:H7 (Cebula *et al.*, 1995) and for the O157 *rfb* gene (Perelle *et al.*, 2004). For the others strains, *wzx* (O26), *wbdI* (O111), *ihp1* (O145) (Perelle *et*

al., 2004) and *wzx* (O103) (Perelle *et al.*, 2005) were used to identify the specific serogroups. All strains were maintained and stored at -80°C.

Table 1: Strain collection tested.

Strains	reference	origin
<i>E. coli</i> O26	64.36	"Roquefort" type cheese
	191.2	"Roquefort" type cheese
	BPO26	human
	52.4	cream cheese
	60.1	milk
	84.3	cow
	864-11-2-1	"Camembert" type cheese
	261-11	milk
	4198-6	ripening cheese
9003-2	"Camembert" type cheese	
<i>E. coli</i> O103	85.56.11	unknown
	272.1.	"Roquefort" type cheese
	561.3	"Roquefort" type cheese
	182.1	"Roquefort" type cheese
	30/61	"Roquefort" type cheese
	3925-C	raw milk cheese
	PIC1	human stool (HUS)
	09340	"Laguiole" type cheese
	1 1-1	burger (HUS Rouen)
	5609-1	cake batter
<i>E. coli</i> O111	13042010 C08	interlaboratory study interlaboratory study (BP)
	O111-2007	unknown
	54159	unknown
<i>E. coli</i> O145	181.3	"Roquefort" type cheese
	PH27	interlaboratory study (BP)
	F95.320	cheese
	13042010 C08	interlaboratory study
	0145-2007	unknown
	4811	unknown
18981-1	unknown	
<i>E. coli</i> O157	721.4	"Roquefort" type cheese
	40.36.1	"Roquefort" type cheese
	130/42	"Roquefort" type cheese
	A33.35	bovine faeces
	LS27	food (St Louis)
	LS32	human (France)
	071011-35238-1	raw ground beef
	44*12-26 1	raw ground beef
76234 ECO O157H7	goat cheese	
26EC9-2	frozen minced meat	
<i>E. coli</i> O113	V2	treatment clarifier
<i>E. coli</i> O76	V4	plant aerator
<i>E. coli</i>	V11	pork faeces
<i>E. coli</i>	V17	faeces
<i>E. coli</i>	V18	faeces
<i>E. coli</i> O174	360A/1	raw milk cheese
<i>E. coli</i>	V1	unknown
<i>Staphylococcus</i>	STA	unknown
<i>Citrobacter</i>	C8	unknown
<i>E. coli</i>	484	unknown
<i>E. coli</i>	V21	unknown

Fourty-one strains of *E. coli* and eleven other strains were used for sensitivity and specificity studies).

For the specificity study, the *E. coli* strains were individually cultured in buffered BPW (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) at 37°C for 18 to 24 hours.

For the sensitivity study, broth samples were serially diluted in tryptone salt and used individually or mixed with non specific bacteria (10^8 CFU/mL non specific bacteria/ 10^4 CFU/mL STEC).

- **Samples**

25 g samples of fresh raw ground beef artificially inoculated and uninoculated were tested. The percent fat in the meat samples varied from 5 to 15%.

- **Inoculation of samples**

For pre-enrichment inoculation, the strains were inoculated individually in the beef sample at a level of 1-5 CFU/25g sample. To determine the cell numbers in the initial inoculum, 100 μ l aliquots from 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/ml serial dilutions were plated on Tryptic Soy Agar (bioMérieux), incubated at 37°C for 24 hrs and counted. One sample of each type of beef sample was left uninoculated and used as negative control. After homogenisation, the stomacher bags were stored overnight at 4°C to cold-adapt the strains.

For post-enrichment inoculation, the strains were inoculated individually in enrichment broth at a level of 10^2 to 10^5 CFU/mL.

- **Enrichment protocol**

Two enrichment media were tested: BPW without antibiotics and mTSB (modified Tryptone Soya Broth) with novobiocine (12 mg/L) which is recommended for the ISO method using IMS for O157:H7.

More precisely, 225ml of each evaluated enrichment broth was added into the stomacher bag containing 25g of beef sample. After homogenisation, the stomacher bags were incubated for 18-24 hours at 41.5°C for BPW and 37°C for mTSB with novobiocine.

- **Analytical methods**

• **VIDAS ESPT**

VIDAS ESPT is an automated immuno-concentration method using recombinant phage proteins to specifically capture and concentrate *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157.

For analysis, 800µL of enrichment broth is used to perform the VIDAS ESPT method according to the manufacturer's instructions.

The VIDAS ESPT kit includes two ready-to-use components: the Solid Phase Receptacle (SPR) which is coated with specific *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 phage proteins, and a strip which contains all the wash and release solutions.

The concentration is fully automated and performed in 40 minutes using the VIDAS or mini-VIDAS instrument. The immunoconcentrated solution is then plated on specific isolation media.

- **Isolation media**

After the VIDAS ESPT protocol, 100 µL of the immunoconcentrated sample is plated on specific media: ChromID O157 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for *E. coli* O157 isolation, Coli ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Bjorn Possé medium (Possé *et al.*, 2008) for the other serogroups.

- **IMS**

After 24hours of mTSB + novobiocine enrichment, IMS using beads from Dynal® (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) coated with one type of specific antibodies against the serotype of the strain used for inoculation of the sample was performed. IMS was carried out for the five serotypes. IMS was performed according to manufacturer's instructions. Resulting IMS solutions were plated onto selective agar media described above. The performance of this manual method was compared to the automated VIDAS ESPT.

RESULTS

- **Sensitivity and specificity study on pure culture strains**

The specificity study showed only two non specific bacteria with VIDAS ESPT assay. All results are detailed in table 2.

Table 2: Specificity results of VIDAS ESPT on broths of STEC and non-STECS strains.

Strains	Number tested	Detected after VIDAS ESPT
<i>E. coli</i> O26	10	10
<i>E. coli</i> O103	10	10
<i>E. coli</i> O111	4	4
<i>E. coli</i> O145	7	7
<i>E. coli</i> O157	10	10
Others (<i>Citrobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> ...)	11	2

The sensitivity study performed on the dilutions of pure cultures of STEC showed a threshold of the VIDAS ESPT around 10^2 - 10^3 CFU/mL. The same study made with dilutions of specific STEC strains mixed with non-specific bacteria, showed a sensitivity threshold of the test between 10^2 and 10^4 CFU/mL according to serogroups (Table 3).

Table 3: Threshold concentration for VIDAS ESPT on broths of STEC and non-STEC strains.

Serogroup	O26	O103	O111	O145	O157
ESPT sensitivity (CFU/mL) pure broth suspension of STEC	10^3	10^2	10^2	10^3	10^2
ESPT sensitivity (CFU/mL) broth suspension of STEC with another non-STEC bacteria	10^4	10^2	10^2	10^4	10^2

The threshold was determined as soon as specific strains were isolated on plates

- Sensitivity study on artificially inoculated samples

The assay performed post-enrichment, on artificially inoculated samples showed a sensitivity threshold of the VIDAS ESPT for *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 research around 10^3 - 10^4 CFU/mL according to the serogroups. With the IMS method the results showed a sensitivity threshold of 10^3 - 10^5 CFU/mL according to the serogroups (Table 4).

Table 4: Performance of two immuno-concentration methods: VIDAS ESPT and IMS, for the isolation of “gang of five” in post enriched raw ground beef samples artificially inoculated.

<i>E. coli</i> strains	Methods	Dilutions (CFU/mL)			
		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
O26	VIDAS ESPT	+	+	+	-
	IMS	+	+	+	-
O103	VIDAS ESPT	+	+	+	-
	IMS	+	+	+	-
O111	VIDAS ESPT	+	+	-	-
	IMS	+	+	-	-
O145	VIDAS ESPT	+	+	-	-
	IMS	+	-	-	-
O157	VIDAS ESPT	+	+	+	-
	IMS	+	+	-	-

+: all tested strains were found on the isolation media

- : at least one of the strains was not found on the isolation media

The assay performed on artificially inoculated samples (1 to 5 CFU/25g) followed by enrichment showed high sensitivity for the isolation of STEC strains both the VIDAS ESPT and IMS methods. Five strains of each serogroup were tested and all were isolated after VIDAS ESPT and IMS methods. Compared to traditional IMS plates, VIDAS ESPT method gave less background flora. VIDAS ESPT automated method greatly facilitated the recovery of serogroups of interest.

DISCUSSION

Escherichia coli O157:H7 is the predominant and most virulent serotype of STEC. Nevertheless, other non-O157 serogroups, including O26, O103, O111 and O145 have been associated with occasional outbreaks human disease or sporadic cases. Sensitive and rapid detection methods for these five serogroups are essential for the food industry to ensure a safe food supply.

Diagnostic procedure for STEC has been developed primarily for *E. coli* O157:H7. All existing validated methods research this serogroup. Detection of non-O157 STEC relies on direct analysis of colonies on plates of limited selectivity or by immunoblotting or DNA probing. Immuno magnetic separation (IMS) is used for selective concentration of serogroups O26, O103, O111, O145 and O157 from pre-enriched samples to assist in plate isolation.

The VIDAS ESPT is a new method, allowing immuno-concentration of the “gang of five” simultaneously using a new technology of phage recombinant protein. This specificity of phage is the result of billions of years of evolutionary pressure between the phage and the host

bacteria and the ability of producing recombinant phage proteins for specific capture of bacteria must be considered as a tool with unrivalled properties for bacterial detection methods.

This novel phage immuno-concentration method was compared to IMS. Nevertheless, with IMS method, serogroups are immuno-concentrated separately. The IMS reagents are serogroup specific while with the VIDAS ESPT immuno-concentrates refine serogroups simultaneously. One must be aware that this test is an automated system.

This study was designed to compare the VIDAS ESPT and IMS method for their ability to enrich the levels of STEC in samples after enrichment. Sensitivity and specificity studies were realised on pure cultures and on artificially inoculated meat samples.

For the specificity study, the non-specific strains were tested at high concentrations (10^8 CFU/mL). We could conjectured that the two strains (*Citrobacter* and “V21”*E. coli*) were found positive with the VIDAS ESPT because of such high concentration. In this context, specificity of the VIDAS ESPT for *E. coli* O26, O103, O111 and O145 could be enhanced by the introduction of more selective media. More discriminated media are needed for the detection of *E. coli* O26, O103, O111 and O145. Hiramatsu *et al.* have shown that many strains of *E. coli* O26 do not ferment rhamnose. This finding suggested that MacConkey agar containing rhamnose may be used to enhance the detection of this serogroup from faecal and food samples (Hiramatsu *et al.*, 2002). Possé *et al.* (2008) described a new differential and confirmation media for O26, O103, O111, O145 and O157 isolation from food or faeces.

Our study showed that both the VIDAS ESPT and IMS methods produced comparable results. However with VIDAS ESPT, less background microflora was presented on the selective plates. Sensitivity thresholds were around 10^3 CFU/mL in pure culture mixed or not, and approximatively 10^4 CFU/mL in artificially inoculated meat samples.

VIDAS ESPT showed some variability in the sensitivity threshold between serogroups both in pure culture and in beef matrices tested. Multiple factors might explain the difference in cell-capture efficiency. For example, interference from components of the ground beef (fat molecules, background microflora...) might interact with the phage protein or the surface of the bacteria, which may block the binding. The variability in sensitivity between serogroups could be explained by different affinity constants between the phage protein and the specific bacterial binding site.

IMS sensitivity may also be affected by the bead-to-organism ratio used the enrichment broth, and the problem of non-specific adsorption to the magnetic beads (which can be reduced by the use of a low ionic strength solution in the IMS procedure and washing). Other studies have evaluated the efficiency of IMS: the O26 and O111 IMS beads have been evaluated for the detection of these STEC serogroups in vegetables (Safarikova and Safarik, 2001) and O103 IMS beads have been used to detect O103 serogroup in sheep faecal samples (Urdahl *et al.*, 2002). Safarikova and Safarik (2001) found that IMS increased the isolation of *E. coli* O26, O103 and O111 in vegetables with 93-100% of samples positive by IMS compared to 36-93% using direct culture.

Our study showed that the VIDAS ESPT can perform the immuno-concentration automatically within 60 min for the five serogroups reported, with a maximum capacity of 30 samples in one run. In contrast, for the IMS method the concentration of 30 samples for one serogroup takes about 100 min when using two magnetic particle concentrators, each fitted to handle 6 samples at a time (Aminul Islam *et al.*, 2006). Aminul Islam *et al.* (2006) found that IMS method also has a potential risk for cross-contamination during the performance of immunomagnetic separation. Compared with IMS method, the VIDAS ESPT are less time-consuming and are fully automated and thus less labor intensive.

This study has demonstrated that the VIDAS ESPT is a promising tool to isolate *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 from food in a single assay, facilitates their subsequent identification on selective agar plates.

This test could be used as a sample preparation in order to establish pathogenic status of enrichment broth with a PCR assay. It would reduced the number of non-relevant PCR positive results and so the number of confirmation. This automated method will provide technical and economic advantages to the food industry for routine testing by reducing the number of false positive PCR screen samples that need to be run through the confirmation process. Works are underway in order to validate these data.

REFERENCES

Aminul Islam, M., A. E. Heuvelink, K. A. Talukder, and E. de Boer. 2006. Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces

and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. *Int. J. Food Microbiol.* **109**:151–156.

Bettelheim K.A. (2000) Role of non-O157 VTEC. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 38S-50S.

Bettelheim K.A. (2003) Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox and paradigm. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**: 333-344.

Bettelheim K.A. (2007) The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Critical reviews in Microbiology* **33**: 67-87.

Beutin L. (2006) Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **53**: 299-305.

Cebula T.A., Payne W.L., Feng P. (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33(1)**: 248-250.

Dobson, R. (2006) Report on *E. coli* outbreak recommends a review of guidance. *Brit. Med. J.* **332**: 72.

Hiramatsu R., Matsumoto M., Miwa Y., Suzuki Y., Saito M. and Miyazaki Y. (2002) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 922-925.

ISO (2001) Microbiological Methods, ISO 16654: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for the Detection of *Escherichia coli* O157 **First Edition**.

Jenkins C., Pearce M.C., Smith A.W., Knight H.I., Shaw D.J., Cheasty T., Foster G., Gunn G.J., Dougan G., Smith H.R., Frankel G. (2003) Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 207-212.

Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. and Majid, F. (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* **111**: 181–187.

Pearce, M.C., Evans, J., McKendrick, I.J., Smith, A.W., Knight, H.I., Mellor, D.J., Woolhouse, M.E.J., Gun, G.J., Low, J.C. (2006) Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroup O26, O103, O111 and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(1)**: 653-659.

Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P. (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7 associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* **18**: 185-192.

Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P. (2005) Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **98 (5)**: 1162-1168.

Possé B., De Zutter L., Heyndrickx M. and Herman L. (2008) Novel differential and confirmation plating media for Shigatoxin producing *E. coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive and negative O157. *FEMS Letters in microbiology.* **282**: 124-131.

Pritchard, G.C., Willshaw, G.A., Bailey, J.R., Carson, T. and Cheasty, T. (2000) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal study. *Vet. Record* **147**: 259–264.

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., Cohen M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 36-39.

Safaríková M., Safarík I. (2001) Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. *Lett Appl Microbiol.* **33(1)**: 36-39.

Schmidt H., Geitz C., Tarr P.I., Frosch M. and Karch H. (1999) Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* **179**, 115-123.

Upton, P. and Coia, J.E. (1994) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* **344**: 1015.

Urdahl A.M., Cudjoe K., Wahl E., Heir E., Wasteson Y. (2002) Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103 from sheep using automated immunomagnetic separation (AIMS) and AIMS-ELISA: sheep as the source of a clinical *E. coli* O103 case? *Lett Appl Microbiol.* **35(3)**:218-222.

Vimont A., Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Lazizzera C., Bavai C. and Delignette-Muller M.L. (2006) Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background Microflora for various enrichment protocols. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(1)**: 261-268.

Willshaw G.A., Smith H.R., Cheasty T., O'Brien S.J. (2001) Use of strain typing to provide evidence for specific interventions in the transmission of VTEC O157 infections. *Int. J. Food Microbiol.* **66**: 39-46.

3.3. Conclusion

Escherichia coli O157:H7 est le sérotype prédominant et le plus virulent des STEC. Néanmoins, d'autres sérogroupes comme O26, O111, O103, O145 ont été associées à des épisodes occasionnels ou sporadiques de maladies humaines. La mise au point de méthodes de détection sensibles et rapides pour ces 5 sérogroupes est donc essentielle pour l'industrie agro-alimentaire afin d'assurer aux consommateurs des produits sains.

Le VIDAS ESPT est une nouvelle méthode, permettant la concentration du « gang des 5 » en une seule fois et utilisant une nouvelle technologie : les protéines de phage. Les protéines de phage ont montré dans de précédentes études de très bonnes performances notamment en terme de spécificité et sensibilité du phage ciblant le sérotype O157 (Rozand and Feng, 2009).

Cette nouvelle méthode de concentration peut être comparée à celle de l'IMS parce qu'elle repose sur le même principe. Toutefois, l'IMS n'immuno-concentre qu'un séro groupe à la fois alors que le VIDAS ESPT permet la concentration des 5 sérogroupes en même temps. Cette nouvelle technique présente également l'avantage d'être automatisée.

Cette étude avait pour but de comparer les performances en termes de sensibilité et spécificité du VIDAS ESPT et de l'IMS pour la recherche de faibles niveaux de STEC dans les aliments. Pour la spécificité, le VIDAS ESPT et l'IMS ont montré des résultats semblables. Toutefois après un VIDAS ESPT les géloses obtenues présentaient moins de flore annexe que celle réalisées après un IMS. Néanmoins, notre étude a montré que la spécificité de ces méthodes pourrait être améliorée par l'utilisation de géloses d'isolement plus sélectives et spécifiques. Pourtant, à ce jour, il n'existe aucun milieu spécifique disponible pour les STEC non-O157. La difficulté d'élaboration d'un tel milieu réside dans le fait que ces sérogroupes ont des caractéristiques biochimiques et des besoins différents. Possé *et al.* (2008) a mis au point une gélose permettant le développement et la différenciation des sérogroupes O26, O103, O111, O145 et O157 à partir d'échantillons d'aliments ou de matières fécales.

Cette étude a également permis d'établir le seuil de sensibilité du VIDAS ESPT pour la recherche des 5 sérogroupes de STEC. Celui-ci se situe aux environs de 10^3 UFC/mL dans les bouillons de souches pures et 10^4 UFC/mL dans les échantillons de viandes de bœuf.

Une certaine variabilité des résultats a été observée entre les sérogroupes. De multiples facteurs pourraient expliquer ce phénomène : d'une part, la composition des échantillons (molécules de gras, flore annexe importante...) pourrait avoir un impact sur la liaison entre la protéine de phage et la bactérie cible en la bloquant ; d'autre part, la liaison entre la protéine de phage et la bactérie cible pourrait ne pas être suffisamment forte pour résister aux différentes étapes du protocole du VIDAS ESPT. En effet, en dépit de la spécificité de ces protéines de phage, il n'y a que peu ou pas d'informations concernant leur stabilité dans le temps et leur résistance aux différents protocoles qui peuvent leur être appliqués.

De la même façon, la sensibilité de l'IMS pourrait être affectée par le taux de dilution de l'enrichissement, mais aussi sa nature, et par les problèmes de spécificité des billes magnétiques utilisées.

L'AFSSA préconise la recherche de 5 sérogroupes majeurs : O26, O103, O111, O145 et O157. Le VIDAS ESPT et l'IMS permettent toutes deux la recherche de ces 5 sérogroupes. Toutefois, le VIDAS ESPT permet de réaliser cette analyse en une fois alors que l'IMS nécessite 5 tests. De plus, l'utilisation d'une méthode automatisée, type VIDAS, minimise les

risques de contaminations croisées observées lors de la réalisation d'un IMS (Aminul Islam *et al.*, 2006).

Cette étude a démontré que le VIDAS ESPT est un outil prometteur pour l'isolement des *E. coli* O157, O26, O103, O111 et O145 dans les aliments en un seul test, et pour leur identification sur des géloses sélectives.

Ce test pourrait être utilisé comme préparation d'échantillon avant un test PCR pour établir le statut pathogène d'un bouillon d'enrichissement et ainsi s'inscrire dans le nouveau protocole du CEN actuellement à l'étude. Il permettrait de réduire le nombre de résultats faux-positifs de première intention et donc le nombre de confirmation. Des travaux sont en cours afin de valider la faisabilité de l'utilisation de cet outil avant une PCR et d'en évaluer les performances.

Cette méthode automatisée offre des avantages techniques et économiques pour les industriels de l'agro-alimentaire et pourrait être utilisée pour les analyses de routine.

Discussion et perspectives

Tout au long de ce mémoire, nous nous sommes efforcés de montrer l'importance de la détection des STEC pathogènes dans les aliments pour les industriels désireux de mettre sur le marché des produits sains, mais également pour les gestionnaires du risque. La forte implication du sérotype O157:H7 dans les cas graves et les épidémies a conduit au développement de méthodes validées pour faciliter sa détection et son isolement à partir de matrices alimentaires. Pourtant, l'avis de l'AFSSA du 11 janvier 2011 recommande la recherche de quatre autres sérogroupes de STEC définis comme pathogènes : O26, O103, O111 et O145. Les sérogroupes de STEC non-O157 sont de plus en plus impliqués dans les cas humains. En l'absence de méthodes validées, différents types d'approches sont généralement utilisés pour les détecter. La plus souvent employée consiste à rechercher les souches porteuses des gènes *eae* et *stx* puis d'isoler les souches directement ou indirectement (en passant par l'IMS) sur des géloses plus ou moins spécifiques.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour objectif l'optimisation du protocole de recherche des cinq sérogroupes majeurs de STEC. Ce protocole repose sur quatre grandes étapes : la prise d'essai, l'enrichissement, la détection et la confirmation. Le travail réalisé à différents niveaux de ce protocole nous a permis de soulever certains points importants comme par exemple la difficulté de mettre en œuvre des enrichissements appropriés, l'utilisation de la PCR en temps réel pour cribler des échantillons alimentaires et les problèmes liés à l'isolement des souches non-O157 pour confirmer les résultats.

L'enrichissement des STEC

Nous avons souligné l'importance de différents facteurs lors de l'étape d'enrichissement. Ainsi, cette étape nécessite des bouillons appropriés, des températures favorisant le développement des STEC et une durée minimale permettant de réduire la durée de l'analyse.

- Les bouillons employés :

De nombreuses études ont été menées sur l'EPT (Ogden *et al.*, 2001; Drysdale *et al.*, 2004; Hussein et Bollinger, 2008). Nous avons confirmé au cours de notre étude sur le VIDAS ECPT UP que ce bouillon utilisé avec une prise d'essai de l'échantillon de 25g ou complété par de la vancomycine pour un échantillon de 375g convenait parfaitement pour la détection des *E. coli* O157:H7 dans la viande de bœuf. Pourtant, la méthode normalisée de référence pour l'isolement d'*E. coli* O157 (ISO 16654) à partir de l'aliment préconise un enrichissement en milieu mTSB additionné de novobiocine. D'autres milieux peuvent donc

être utilisés en fonction de la méthode de détection et de l'aliment dans lequel la bactérie est recherchée.

Les données bibliographiques sont beaucoup moins fournies pour les 4 autres sérotypes. Plusieurs études ont été menées sur ces différents sérogroupes et divers milieux ont été publiés. Pour *E. coli* O26 le mTSB avec ou sans novobiocine et le mEC ont été évalués (Kanki *et al.*, 2009 ; Murphy *et al.*, 2007). Ils montrent des résultats variables selon les matrices. Les investigations menées au cours de cette thèse sur un panel varié de fromages ont mis en évidence qu'un enrichissement composé d'EPT+acriflavine+CT permettait la détection des *E. coli* O26 après 24 h d'incubation à 41,5°C. Il convient de noter que cette étude a été réalisée sur uniquement trois souches de *E. coli* O26. Il serait donc intéressant de confirmer les résultats obtenus et de valider cet enrichissement en utilisant un plus grand nombre de souches *E. coli* O26 et ce, sur un plus grand nombre de fromages (au lait pasteurisé notamment).

Par ailleurs, il sera important d'évaluer cet enrichissement sur d'autres produits comme la viande car les *E. coli* O26 ont également été à l'origine d'épidémies liées à la consommation de viande hachée notamment. Les flores bactériennes variants d'un type d'aliment à l'autre, l'enrichissement ne sera pas forcément aussi efficace. Les agents sélectifs utilisés pourraient ne pas être appropriés à la flore de la viande.

Il semble légitime de se demander également si un tel milieu conviendrait aux autres sérogroupes de STEC dans la mesure où les milieux les plus fréquemment utilisés pour l'enrichissement de ces bactéries sont le mTSB et le milieu EC (*E. coli*) (Vimont *et al.*, 2006). Il a également été montré que le choix et le dosage des agents sélectifs ajoutés au bouillon de base doivent se faire avec soin en fonction de la bactérie recherchée et de l'aliment étudié. Vimont *et al.* (2006) ont montré que la novobiocine, bien qu'étant l'agent sélectif le plus souvent utilisé dans les bouillons, entraîne un ralentissement voire une inhibition de la croissance de certaines souches de STEC pouvant impliquer l'obtention de résultats faussement négatifs. Cette même étude aurait également montré une certaine sensibilité des souches STEC à l'acriflavine alors que c'est précisément l'agent que l'on a choisi pour permettre l'enrichissement des *E. coli* O26 dans les fromages au lait cru.

Concernant *E. coli* O145, Fratamico *et al.* (2009) ont utilisé le bouillon mEC supplémenté en novobiocine. Les *E. coli* O111 ne semblent pas se développer dans du mTSB+novobiocine (Murphy *et al.*, 2007) mais croître d'avantage dans du TSB+céfixime+vancomycine (O'Hanlon *et al.*, 2004). L'enrichissement des *E. coli* O103 est encore moins étudié que les

autres, mais Hussein *et al.* (2008) ont réussi à les détecter dans un bouillon BHI complété par différents antibiotiques (novobiocine, vancomycine, cefixime,...).

Toutes ces données suggèrent qu'il serait intéressant d'étudier les effets d'autres agents sélectifs sur la croissance de différents sérotypes de STEC mais également sur la croissance de diverses flores annexes (très variables en fonction des aliments analysés). En effet, Szalo *et al.* (1986) ont montré, par exemple, qu'une concentration trop élevée en sels biliaires pouvait inhiber la croissance des STEC. Les agents sélectifs entraînant potentiellement un ralentissement ou une inhibition de la croissance de certaines souches de STEC seraient alors clairement identifiés. L'éviction de ces agents sélectifs de la composition de certains milieux d'enrichissement ou l'ajustement de leur concentration pourraient ainsi être définitivement arrêtés.

Par ailleurs, il est important de rappeler que bien que la viande hachée de bœuf et les fromages au lait cru sont le plus souvent impliqués dans des épidémies ou des cas sporadiques d'infection à STEC, les végétaux tels que les épinards ou la salade ont également été pointés du doigt. Il semble donc nécessaire de mettre également au point des bouillons d'enrichissements pour les détecter dans de telles matrices.

Enfin, par mesure de prévention, ou lorsque des denrées alimentaires sont contaminées par des STEC pathogènes, les industriels mènent souvent des recherches de STEC en amont de leurs fabrications. En effet, ces derniers peuvent être amenés à chercher l'origine des contaminations dans les abattoirs ou chez les éleveurs. La nature des échantillons testés est alors bien différente des aliments (ensilages, foins, fèces.....) et les bouillons d'enrichissement utilisés lors de la détection des bactéries restent à être mis au point.

- La température

Au cours de nos différentes études, l'incubation de nos bouillons se faisait à 37°C lorsque nous réalisons la méthode de référence et à 41.5°C pour les autres méthodes. De nombreuses études ont montré que lors de la détection de *E. coli* O157:H7 dans de la viande, la température d'enrichissement des bouillons était de 41.5°C (Gonthier *et al.*, 2001; Nielsen and Andersen, 2003). Cette température semble intéressante puisqu'elle inhibe le développement de certaines flores potentiellement présentes dans l'aliment testé. Néanmoins, peu de recherches ont été menées sur la température à appliquer lors de la recherche du même

sérotype dans d'autres aliments. Par ailleurs, il existe peu de données sur la température optimale de croissance des STEC non-O157 dans les bouillons d'enrichissement, mais dans la plupart des protocoles, la croissance des STEC est généralement effectuée à 37°C, ou à 41°C (Vimont *et al.*, 2006).

- La durée d'incubation

Nos travaux ont montré que la durée d'enrichissement de viande pouvait varier en fonction de la prise d'essai. En effet, lors de notre étude sur le VIDAS ECPT UP, une incubation de 6h suffisait pour un échantillon de viande de 25g alors que 18-24h étaient nécessaires pour la recherche des *E. coli* O157 dans un échantillon de 375g. En revanche, lors de l'étude sur la recherche des *E. coli* O26, 18 à 24h d'enrichissement étaient nécessaires pour les détecter dans des échantillons de 25g de fromages. Par conséquent, il semble raisonnable de penser que la durée d'incubation dépend non seulement de la matrice à analyser mais aussi de la bactérie et dans notre cas du sérotype recherché.

La durée d'incubation est également variable en fonction du protocole, allant de 6 à 24 heures (Verstraete *et al.*, 2010). Uyttendaele *et al.* (1998), ont étudié l'effet d'un stress par le froid sur la durée d'un enrichissement en eau peptonnée tamponnée (EPT) à 37°C pour la détection de souches EHEC O26 et O157 dans du boeuf haché. Un temps d'incubation de 6 heures était suffisant pour détecter un inoculum de départ de 1 à 10 UFC.g⁻¹. Quand les bactéries étaient exposées au froid (+4°C ou -20°C), une période d'enrichissement de 24 heures était recommandée.

Plusieurs durées d'incubation peuvent également être combinées comme dans la méthode mise au point par Possé *et al.* (2008) qui comprend une phase de pré-enrichissement à 42°C pendant 6h et un enrichissement à 37°C pendant 18 heures.

Dans la mesure où un grand nombre de facteurs entre en compte pour l'élaboration d'un enrichissement, nous pouvons donc nous demander si un enrichissement commun aux différents sérotypes de STEC est réalisable. En effet, Baylis (2008) a montré que la sensibilité des STEC face aux différents paramètres entrant dans l'élaboration d'un enrichissement, était variable en fonction des sérotypes. Enfin, il serait intéressant pour les industriels de l'agroalimentaire de mettre au point des tests de détection des STEC pathogènes couplés à d'autres bactéries pathogènes comme les salmonelles. Le problème majeur est que de tels tests nécessiteraient un enrichissement commun difficile à mettre au point étant donné

la diversité des STEC et les protocoles actuellement employés pour les salmonelles (souvent en plusieurs étapes).

La détection des STEC

Il existe différentes méthodes commercialisées, à la disposition des industriels ou des laboratoires permettant la détection des *E. coli* O157:H7 : des méthodes immunologiques, génétiques, colorimétriques... Une partie d'entre elles sont validées AFNOR mais la méthode de référence recommandée par les autorités est l'IMS qui est une méthode longue et fastidieuse.

- Méthodes immunologiques :

Une de nos études a porté sur l'optimisation de la recherche de *E. coli* O157:H7 dans la viande de boeuf par la méthode VIDAS ECPT UP. Cette méthode présente l'avantage d'être facile d'utilisation et peut être mise en œuvre dans un laboratoire d'analyses biologiques de routine. Nous avons montré qu'il était possible de réduire nettement le temps d'analyse avec cette méthode puisqu'un enrichissement de 6h suffisait à la détection des *E. coli* O157 dans un échantillon de 25g permettant l'obtention d'un résultat (présence/absence) en 7h contre 48h si l'on utilisait l'IMS. De plus, cette méthode s'est avérée applicable à des échantillons de taille plus importante (375g), améliorant ainsi la probabilité de détecter le pathogène recherché, tout en prenant en compte, d'autre part, les contraintes des industriels de la viande (i.e. rapidité et simplicité de l'analyse, faible coût des tests...). Notons également, que cette méthode permet la détection de faibles taux de contamination puisque nos échantillons ont été ensemencés à un faible niveau (1-5 UFC/25g).

Les résultats obtenus étant encourageants, il serait intéressant d'évaluer les performances de ce test sur d'autres denrées alimentaires comme les produits laitiers par exemple. La détection des bactéries dans les fromages peut être plus difficile à cause du fort taux de matières grasses, de la présence de caséine, de la présence d'une flore naturelle très importante (bactéries lactiques, moisissures...). Il serait intéressant d'évaluer l'impact de tous ces facteurs sur ce test VIDAS.

Cependant de nombreuses autres méthodes existent, et celles qui ne sont pas validées AFNOR (type test de grossesse) ne sont pas toujours fiables. Néanmoins, elles sont souvent préférées par les industriels qui peuvent les appliquer plus rapidement et sans passer par un laboratoire de routine. Certains industriels ayant des moyens plus importants ont donc opté pour une méthode de détection automatisée, mais validée AFNOR comme le VIDAS.

A ce jour, il n'y a aucune méthode validée permettant la détection des *E. coli* autres que O157 et les industriels ne disposent pas de méthode simple d'utilisation pour la détection de telles bactéries. Etant donné les événements de ces dernières années (épidémies, résultats des plans de surveillance) il devenait urgent pour les industriels du lait notamment d'avoir à disposition un test destiné à détecter les *E. coli* O26 dans les fromages.

Le VIDAS EES mis au point par la société BioMérieux a été évalué. Ce test permet la détection conjointe des *E. coli* O157 et O26 sans distinction. Les données obtenues au cours de nos travaux ont montré que le VIDAS EES autorise la détection de *E. coli* O26 ensemencées à un faible niveau (1-10 UFC/25g) dans différents fromages. Précisons que nous avons sélectionné des types de fromage et des technologies fromagères ayant des caractéristiques pouvant avoir un impact sur la détection. Toutefois, nous ne l'avons évalué que sur les fromages au lait cru et le lait. Par conséquent il serait intéressant de l'évaluer notamment sur des fromages au lait pasteurisé, mais également sur d'autres matrices comme la viande hachée.

Soulignons également qu'il n'existe pas d'autres méthodes immunologiques de détection des autres sérogroupes excepté l'IMS. L'IMS permet la détection et l'isolement des cinq sérogroupes de *E. coli* mais seules les billes magnétiques ciblant les *E. coli* O157 sont validées. Les billes ciblant les autres sérogroupes ont été utilisées pour différentes études et ont montré des performances variables en fonction de l'enrichissement choisi et du type d'aliment analysé (Safarikova et Safarik, 2001 ; Urdahl *et al.*, 2002 ; O'Hanlon *et al.*, 2005).

- Méthodes génétiques

La méthode choisie par le projet de spécification technique en cours d'évaluation à l'ISO du CEN TC275/WG6 est destinée à détecter des souches STEC qui peuvent être hautement pathogènes, c'est-à-dire présentant les caractéristiques des souches «EHEC typiques majeures» proposées et recommandées par l'EFSA. Pour mémoire, cette méthode séquentielle comprend :

- une première étape d'enrichissement
- une seconde étape de détection par technique de PCR en temps réel, à partir des acides nucléiques extraits de ce bouillon d'enrichissement, des principaux marqueurs des souches STEC hautement pathogènes (gènes *stx*, gènes *eae*, puis gènes associés aux 5 principaux sérogroupes d'EHEC). Cette étape de détection est séquentielle: ce n'est que si les gènes *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) et *eae* sont présents simultanément que les gènes spécifiques des 5 principaux sérogroupes d'EHEC sont recherchés ;

- une troisième étape d'isolement des bactéries mise en oeuvre uniquement si les résultats obtenus précédemment sont positifs.

- une quatrième étape de caractérisation phénotypique et génotypique des souches d'*E. coli* isolées dans l'étape précédente.

Toutefois, l'utilisation de méthodes PCR directement dans les aliments peut, elle aussi, être problématique en raison de la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase (lipides, protéases, agents chélateurs, etc...). Aussi, l'étape d'extraction des ADN à partir des bouillons d'enrichissement doit être choisie avec soin afin d'obtenir des ADN de qualité. La détection d'un contrôle interne d'amplification est conseillée afin de vérifier l'absence d'inhibition de la PCR. De plus, de nombreuses techniques de PCR sont à disposition et autant de réactifs différents. Il est donc difficile pour les industriels de faire un choix dans la mesure où les seules techniques de PCR validées concernent la recherche du sérotype O157. Aucune des méthodes concernant les autres sérotypes n'a fait l'objet d'une normalisation à ce jour.

Il faut également noter que les techniques de PCR sont difficilement applicables dans les laboratoires de contrôle des industriels pour des raisons de coûts, la nécessité d'avoir un environnement de travail spécifique et contrôlé mais aussi du fait que l'exploitation des résultats demande une certaine expertise que tous les laboratoires n'ont pas.

La recherche des facteurs de virulence en première intention risque également d'entraîner la multiplication de résultats faux positifs que les industriels devront faire confirmer par le LNR, ce qui pourra entraîner un surcoût au niveau des analyses. En effet, des études ont montré la présence des gènes *stx* dans les bouillons liés à la présence de bactériophages dans les aliments testés (la viande par exemple) (Creuzburg et Schmidt, 2007) En effet, les gènes *stx* des *Escherichia coli* sont localisés dans des séquences de bactériophages lambdaïdes intégrés dans le chromosome. Les EHEC auraient donc émergé par conversion lysogénique. Les bactériophages jouent donc un rôle dans le pouvoir pathogène des souches EHEC mais aussi dans la dissémination de facteurs de virulence au sein de la population des *E. coli* et dans l'émergence de nouvelles souches EHEC. En effet, plusieurs études ont montré que les gènes *stx* pouvaient être transmis horizontalement au sein de la population des *E. coli*. L'induction du cycle lytique des phages porteurs des gènes *stx* et la conversion de souches d'*E. coli* ont été démontrées *in vitro* (Herold *et al.*, 2004 ; Muniesa *et al.*, 2000,2004; Watarai *et al.*, 1998) mais aussi *in vivo*, dans le tractus gastro-intestinal de souris (Acheson *et al.*, 1998) ou de ruminants (Cornick *et al.*, 2006).

Ces résultats faux positifs, peuvent avoir des conséquences économiques pour les industriels dans la mesure où ces derniers doivent « bloquer » leur marchandise en attendant les résultats

de confirmation qui détermineront si oui ou non leurs produits sont sains et aptes à être mis sur le marché sans danger pour le consommateur.

La confirmation de la présence de STEC

Au cours de nos travaux, nous avons mis au point un système automatisé utilisant le système VIDAS permettant l'isolement conjoint des cinq sérogroupes majeurs de STEC. L'évaluation des performances de ce système sur des échantillons de viande hachée a donné des résultats comparables ou meilleurs à ceux obtenus avec l'IMS. Notons que nous avons observé une importante différence au niveau de la spécificité. En effet, la flore annexe était beaucoup moins présente sur les géloses obtenues après un VIDAS ESPT qu'après un IMS. L'utilisation de protéines de phage comme élément accrocheur serait donc plus spécifique que les anticorps des billes magnétiques de l'IMS. Ceci reste toutefois à confirmer avec d'autres matrices comme les produits laitiers qui possèdent une flore annexe importante et variée.

D'autres méthodes de confirmation existent comme par exemple, l'isolement direct qui semble être une technique extrêmement difficile à mettre en place dans les laboratoires pour les analyses de routine étant donné qu'il n'existe pas de gélose spécifique aux cinq sérogroupes de STEC.

Une autre méthode est à disposition des laboratoires : l'IMS. Elle est la seule méthode validée pour l'isolement des *E. coli* O157:H7. Des billes magnétiques existent également pour les quatre autres sérogroupes mais elles n'ont pas fait l'objet d'une normalisation. Néanmoins, à ce jour, c'est la seule méthode employée pour l'isolement des STEC non O157. Des études (Auvray *et al.* 2007) ont montré que lors de l'utilisation de l'IMS, la flore annexe, en quantité importante dans des viandes hachées peut gêner l'étape d'isolement ou des *E. coli* n'appartenant pas aux sérogroupes recherchés et de nombreuses bactéries autres qu'*E. coli* peuvent être isolées (*Hafnia*, *Citrobacter*, etc...) (Fitzmaurice *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005).

Une explication supplémentaire pourrait être apportée par le manque de spécificité des anticorps recouvrant les billes magnétiques et conduisant à des isolements non spécifiques. Ce phénomène a été observé par Jenkins *et al.* (2003) dans une étude au cours de laquelle l'IMS avait été utilisée pour isoler des *E. coli* O26, O103, O111 et O145 de fèces de bovins. Une meilleure spécificité de l'IMS pour la détection d'*E. coli* O26 par rapport aux IMS ciblant *E. coli* O103 et O145 avait été constatée. Les performances de l'IMS sont donc remises en cause par certains auteurs. D'autres études pourraient être mises en place afin d'expliquer ce

phénomène mais il serait surtout important de travailler sur la mise au point de géloses à utiliser pour l'isolement.

L'efficacité de ces méthodes de confirmation pourrait être améliorée par la mise au point et l'utilisation de géloses spécifiques. A ce jour, les géloses les plus performantes, sont conçues pour l'isolement du sérotype O157. Les autres sérotypes n'ont pas de gélose qui leur soit réellement spécifique. Des progrès restent donc à faire sur ce point.

Pourtant le milieu mis au point par Possé *et al.* (2008) pourrait apporter un plus en terme de spécificité à notre nouvelle méthode. Il permet l'isolement sur une même gélose des cinq sérotypes de STEC avec des caractéristiques morphologiques des colonies, spécifiques à chacun d'eux. Nous avons constaté en revanche que sa préparation est complexe et rend difficilement envisageable son utilisation pour des analyses de routine.

Une autre méthode d'isolement des souches de STEC non-O157 est basée sur la détection de la production d'entérohémolysine. Beutin *et al.* (1989) ont mis en évidence une association entre la production d'entérohémolysine et la production de Shiga-toxines dans 89% des souches d'*E. coli* appartenant à neuf sérotypes différents. L'activité entérohémolytique peut être détectée après une nuit d'incubation sur gélose au sang contenant des globules rouges de moutons lavés additionnés de calcium. Les colonies isolées avec une activité entérohémolytique doivent être ensuite confirmées pour la présence des gènes *stx* car certaines souches non STEC produisant l'entérohémolysine peuvent également être détectées. Il est donc important d'approfondir les recherches sur ces milieux et de les retravailler pour les rendre plus « accessibles ». De tels milieux permettraient d'améliorer cette étape de confirmation qui est très discutée, mais qui reste indispensable pour éliminer les faux résultats positifs

Rappelons également que l'isolement d'une colonie caractéristique du sérotype suspecté nécessite encore une validation par des techniques comme les tests latex, les galeries Api mais également les analyses génétiques par PCR. Ces analyses complémentaires sont nécessaires pour s'assurer que la bactérie trouvée est bien celle recherchée et qu'elle possède bien les gènes nécessaires à sa virulence.

Pour conclure...

Les travaux décrits dans ce mémoire ont permis d'apporter des améliorations au protocole de détection des STEC grâce à l'optimisation de certaines étapes, notamment en élaborant un enrichissement permettant la croissance des *E. coli* O26 dans les fromages au lait cru en vue de leur détection par une méthode immunologique automatisée : le VIDAS EES. Nous avons

également optimisé les performances de la détection des *E. coli* O157 par le VIDAS ECPT UP dans la viande de bœuf en montrant qu'il était possible de réduire le temps d'enrichissement à 6h avec un échantillon de 25g mais qu'il était également possible d'analyser des prises d'essai plus conséquentes (375g) grâce à cet outil. Enfin, nous avons élaboré un nouvel outil pour l'étape de confirmation qui permet la recherche et l'isolement spécifique des 5 sérogroupes majeurs de STEC. Ce nouveau test, le VIDAS ESPT, permet d'immuno-concentrer en une seule fois les cinq sérogroupes de façon automatisée et les premières études réalisées sur matrices ont permis d'évaluer une sensibilité du test à 10^3 - 10^4 UFC/mL. L'optimisation de certains paramètres et les outils développés au cours des différentes études ont pour but de permettre une meilleure distinction des souches de STEC, contribuant ainsi à une meilleure définition et gestion du risque lié à la présence de STEC dans les aliments.

L'approche retenue pour la spécification technique CEN/ISO, basée sur la recherche des gènes *stx*, du gène *eae* et des marqueurs des 5 sérogroupes, pourrait être appliquée à la détection de certains autres sérotypes émergents d'EHEC comme par exemple O91, O121, O45 et O123. Toutefois, cette nouvelle approche présente des limites avec le principal inconvénient d'isoler de nombreuses souches n'appartenant pas aux sérogroupes associés aux cas humains. Notons également qu'il existe de nombreuses techniques de PCR différentes utilisant des amorces et autres réactifs variés, il sera donc nécessaire de définir précisément ce qui doit être utilisé afin d'éviter les biais liés à cette variabilité de l'offre.

La seule recherche par PCR des marqueurs génétiques associés aux STEC semble plutôt insuffisante pour estimer le risque lié à leur présence dans les aliments. L'étape de confirmation et donc d'isolement reste toujours essentielle pour confirmer les résultats PCR. Il est donc urgent et important de travailler sur cette étape afin de développer des techniques adaptables aux cinq sérogroupes majeurs définis par l'AFSSA et répondant aux attentes des industriels en terme de : coût, praticabilité d'analyse, rapidité d'obtention des résultats. Notons que la méthode mise au point au cours de notre étude, le VIDAS ESPT pourrait très bien s'inscrire dans ce nouveau protocole en tant que « sample prep » afin de diminuer le nombre de faux positifs. Des études sur ce point sont en cours, pour valider cette éventualité et l'intérêt réel qu'elle pourrait avoir.

Gardons enfin en mémoire que la définition elle-même de la pathogénicité des souches est controversée. La France a opté pour une définition relativement restrictive puisque certaines études ont montré que des souches ne possédant pas le gène *eae* avaient été à l'origine de cas

d'infection à STEC (Boerlin *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999). Les protocoles de détection à mettre en place devront donc être adaptables si les textes venaient à être modifiés.

Annexes

Annexe 1: Méthodes validées AOAC pour la recherche de *E. coli* O157:H7
(<http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>).

TECRA <i>E. coli</i> O157 Visual Immunoassay and TECRA <i>E. coli</i> O157 Immunocapture	<u>3M TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd.</u>	November 1, 2000	<i>E. coli</i> O157	raw ground beef, cooked ground beef, raw ground chicken, cooked ground chicken
Pathatrix ULTRA/Auto <i>E. coli</i> O157 Test System	<u>Matrix MicroScience Ltd</u>	April 11, 2002 *Modified October 19, 2009	<i>E. coli</i> O157	raw ground beef
BAX® System PCR Assay for Screening <i>E. coli</i> O157:H7 Kit	<u>Dupont Qualicon, Inc.</u>	February 18, 2004	<i>E. coli</i> O157:H7	Apple cider, orange juice, ground beef
Singlepath® <i>E. coli</i> O157 Lateral Flow Assay	<u>Merck KGaA / EMD Chemicals, Inc.</u>	May 19, 2004	<i>E. coli</i> O157 (including H7)	Raw ground beef & pasteurized milk
ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for <i>Escherichia coli</i> O157	<u>AES Chemunex</u>	May 21, 2004	<i>E. coli</i> O157	Ground beef
ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for <i>Escherichia coli</i> O157:H7	<u>AES Chemunex</u>	May 21, 2004	<i>E. coli</i> O157:H7	Ground beef
Duopath® Verotoxin Lateral Flow Assay	<u>EMD Chemicals, Inc.</u>	July 23, 2004	Verotoxin producing <i>E. coli</i>	Pure culture
VIDAS® <i>E. coli</i> O157 (ECO) Test with O157:H7 ID Agar: 8 Hour and 24 Hour Methods	<u>bioMérieux, sa</u>	January 18, 2005	<i>E. coli</i> O157 (including H7)	Raw ground beef
BAX® System PCR Assay for Screening <i>E. coli</i> O157:H7 MP	<u>DuPont Qualicon, Inc.</u>	June 1, 2005 *Matrix Extension 6-8-09	<i>E. coli</i> O157:H7	<u>Raw Ground Beef, Beef Trim Spinach & Lettuce</u>
BBL ♦ CHROMagar ♦ O157	<u>BD Diagnostics</u>	September 26, 2005	<i>E. coli</i> O157:H7	Raw ground beef, unpasteurized apple cider

DuPont Lateral Flow System <i>E. coli</i> O157 Test Kit	<u>DuPont Qualicon</u>	January 23, 2006	<i>E. coli</i> O157	Boneless beef, ground beef, apple cider
TEMPO® EC (<i>E. coli</i>) Test	<u>bioMérieux s.a.</u>	August 8, 2006	<i>E. coli</i>	<u>Variety of Foods</u>
foodproof® <i>E. coli</i> O157 Detection Kit in combination with foodproof® ShortPrep II Kit or foodproof® StarPrep One Kit	<u>BIOTECON Diagnostics GmbH</u> Distributed by <u>Merck KGaA / EMD Chemicals, Inc.</u>	November 1, 2006	<i>E. coli</i> O157	<u>Variety of foods</u>
RAPID' <i>E. coli</i> O157:H7 Agar	<u>Bio-Rad Laboratories</u>	June 26, 2007	<i>E. coli</i> O157 : H7	Raw ground beef and fresh spinach
iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7 Real-Time PCR Test Kit	<u>Bio-Rad Laboratories</u>	February 6, 2008	<i>E. coli</i> O157:H7	Ground beef, apple cider, fresh spinach
RapidChek® SELECT ♦ <i>E. coli</i> O157	<u>Strategic Diagnostics, Inc.</u>	July 25, 2008 *Modified October 22, 2009	<i>E. coli</i> O157	Raw ground beef & Boneless beef trim, 375g raw ground beef & beef trim samples
FoodChek™ <i>E. coli</i> O157	<u>FoodChek Systems Inc.</u>	June 11, 2009 * Modified June 28, 2010	<i>E. coli</i> O157:H7	375g Raw ground beef, 375g raw beef trim
VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157 (including H&) (ECPT) Test with VIDAS Immuno Concentration (ICE) & ChromID O157:H7 Agar	<u>bioMérieux, Inc.</u>	June 25, 2009	<i>E. coli</i> O157:H7	Ground beef, beef trimmings (with sample sizes: 25g, 75g & 375g composit & wet pooled samples 75g & 375g), bagged lettuce, fresh spinach & irrigation water
<i>E. coli</i> O157:H7 LT Test Kit	<u>Idaho Technology, Inc.</u>	October 05, 2009	<i>E. coli</i> O157:H7	Raw ground beef, uncooked spinach
BAX® System Real-Time PCR Assay for <i>E. coli</i> O157:H7	<u>DuPont Qualicon</u>	March 09, 2010	<i>E. coli</i> O157:H7	Lettuce & spinach / 375g Beef trim & 65g ground beef
MicroSEQ® <i>E. coli</i> O157:H7 Detection Kit	<u>Applied Biosystems</u>	July 14, 2010	<i>E. coli</i> O157:H7	375g Raw ground beef & raw beef trim 25g ground beef & raw beef trim; spinach, organ juice, apple juice

Annexe 2 : Méthodes validées AOAC pour la recherche des *E. coli* et autres coliformes.
 (<http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>)

Compact Dry EC	<u>Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd</u>	November 18 2004	Coliforms & <i>E. coli</i>	Raw ground pork, raw pork, raw lamb, raw veal & raw ground beef
RAPID' <i>E. coli</i> 2 Agar	<u>Bio-Rad Laboratories</u>	May 10, 2006	<i>E. coli</i> and total coliforms	<u>Variety of Foods</u>
Combined <i>E. coli</i> and Total Coliform Test	<u>Pathogen Detection Systems, Inc.</u>	January 7, 2008	<i>Escherichia coli</i> and Total Coliforms	Tap water, well water, lake water, vegetable wash water, bottled water, sugar-free lemon iced tea
DOX 60F/30F Coliforms & <i>E. coli</i>	Manufactured by <u>Bio-Theta, Ltd.</u> Developed by Daikin Industries, Ltd.	December 30, 2008	<i>E. coli</i> & Total Coliforms	Raw beef, raw ground beef, chicken carcass rinses
Chromocult® Coliform Agar	<u>Merck KGaA</u>	February 27, 2009	Coliforms & <i>E. coli</i>	Frankfurters, cooked chicken & nonfat dried milk
Sanita-kun <i>E. coli</i> & Coliform Sheet Medium and RIDA Count <i>E. coli</i> /Coliform	<u>Chisso Corporation</u>	July 24 , 2009	<i>E. coli</i> and Coliforms	Raw beef, raw pork, frozen raw ground beef, frozen raw ground pork and ham

Annexe 3: Souches utilisées au cours de l'étude concernant le VIDAS ESPT

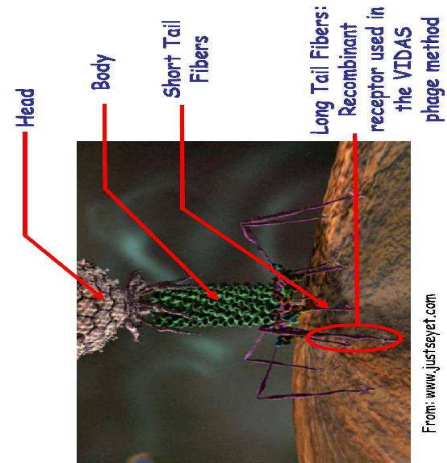
				gènes de virulence			
		référence	origine	eae	stx c	stx1	stx 2
Souches spécifiques	O103	85.56.11		+	+		
		272.1.	roquefort	-	-		
		561.3	roquefort	-	-		
		182.1	roquefort	-	+		
		30/61	roquefort	+	+		
		3925-C	fromage au lait cru	+	+	+	
		PIC1	Selles issues SHU adultes	+	+	+	
		09340	Fromage Laguiole	-	-		
		1 1-1	steak haché-SHU Rouen	-	-		
		5609-1	Pâte à gâteau cru	+	+		
	O157	721.4	roquefort	+	+	-	+
		40.36.1	roquefort	+	+		
		130/42	roquefort	+	+		
		A33.35	Fecès bovins	+	+		
		LS27	Aliments (St Louis)	+	+		
		LS32	Humain (France)	+	+		
		071011-35238-1	viande hachée bœuf	+	+	+	-
		44*12-26 1	viande hachée bœuf	+	+	-	+
		76234 ECO O157H7	Fromage Chèvre	+	+	-	+
		26EC9-2	viande hachée surgelée	+	+	+	+
	O145	181.3	roquefort	+	-	-	-
		PH27	B.Possé	+	-		
		F95.320	fromage	+	-		
		13042010 C08	étude interlabo	+	+		
		0145-2007	?				
		4811	?	+	-		
		18981-1	?	+	-		
	O26	64.36	roquefort	+	-		
		191.2	roquefort	+	-	-	-
			B.Possé				
		52.4	Fromage blanc	+	+		
		60.1	Lait	+	-		
		84.3	Vaches	+	-		
		864-11-2-1	Camembert lait cru	+	-	-	-
		261-11	lait mûré	+	-	-	-
		4198-6	Fromage cours affinage	+	-		
	O111	9003-2	camembert	+	-		
		13042010 C08	étude interlabo	+	+		
			B.possé	+	-		
		O111-2007	?				
		54159	?				
	Souches non spécifiques	O113	V2	treatment clarifier	-	+	
O76		V4	plant aerator	+	+		
O?		V11	feces de porc	-	+		+
O?		V17	bouse	+	+		
O?		V18	bouse	+	+		
O174		360A/1	fromage au lait cru	-	+		
		V1		-	+		
Staph				-	-		
Citro				-	-		
		484		-	+		
		V21		-	+		

Annexe 5: Novel phage ligand based method for same day detection of *E.coli* O157:H7 in composite sample of raw ground beef. D.Thevenot, M.Bouvier, A.Gleizal, F.Savoie and C.Vernozy-Rozand.

P 094

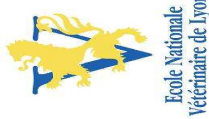
INTRODUCTION

Most commercial detection kits for *E. coli* O157:H7 have been validated for testing 25 g samples. This sampling size does not provide meaningful results for large batches of ground beef which may be contaminated at very low levels. To better meet desired food safety objectives and to allow a more statistically representative sampling protocol, the testing of 375 g composite sample has been recommended. However, high microbial content foods can challenge the robustness and sensitivity of detection methods due to low target to non target ratios. Novel bacteriophage derived recombinant receptor were suggested to solve this problem. Throughout billions of years phages have developed strategies to recognize structural elements that are indispensable for their specific host. For this reason, phage derived recognition elements must be considered as a tool with unvalued properties regarding their host specificity, rendering them an ideal tool for bacterial detection assays. This study was designed to compare the sensitivity of the novel VIDAS *E. coli* O157:H7 phage ligand capture assay with PCR method validated by the USDA, in detecting low contamination levels of this pathogen for different raw ground beef sample sizes (25, 75 and 375g).

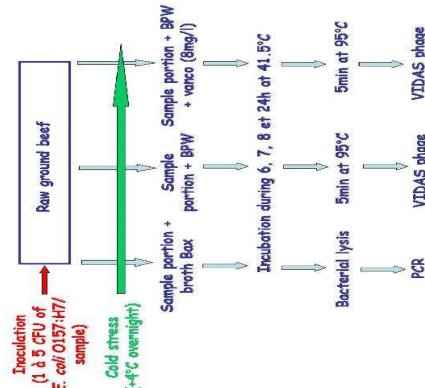


Novel Phage Ligand Based Method For Same Day Detection Of *E. coli* O157:H7 In Composite Samples Of Raw Ground Beef

D. Thevenot*, M. Bouvier*, A. Gleizal*, F. Savoie* and C. Vernozy-Rozand**
 *Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisonnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
 ** Presenting author.



METHOD



RESULTS

Sample portion	Détection	Broth	Enrichissement duration (hours)							
			4	5	6	7	8	24		
25g	PCR	PCR broth	1/15	8/15	11/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
	VDAS PHAGE	BPW	6/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	
	VDAS PHAGE	BPW+Varco	3/15	14/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	
75g	PCR	PCR broth	0/15	0/15	1/15	0/15	1/15	2/15	2/15	
	VDAS PHAGE	BPW	2/15	8/15	14/15	15/15	15/15	15/15		
	VDAS PHAGE	BPW+Varco	1/15	12/15	15/15	15/15	15/15	15/15		
375g	PCR	PCR broth	ND	ND	0/15	2/15	0/15	6/15	6/15	
	VDAS PHAGE	BPW	ND	ND	0/15	0/15	8/15	15/15		
	VDAS PHAGE	BPW+Varco	ND	ND	0/15	4/15	15/15	15/15		

ND: Not Done

Sample size	25g	75g	375g
Inoculation level	3-7 UFC/25g	1-8 UFC/75g	2-8 UFC/375g
Inoculation time	8 h	8 h	8 h
VDAS % positive results	100%	100%	100%
USDA validated PCR method results	100%	6.8%	40%

DISCUSSION

The kinetic studies clearly showed the shortest incubation times which allowed optimum detection of *E. coli* O157:H7 with VIDAS phage assay. Indeed, for 25 and 75 g samples, a 6 hr enrichment and for the 375 g, an 8 hr enrichment gave the same number of positive samples as the 24 hr final test point. The increased robustness of the new phage based technology compared to a real time PCR method, when challenged with a high concentration of matrix (1/4 versus 1/10) is probably due to the very efficient binding of the receptor which underlines the high selective evolutionary pressure.

CONCLUSION

In the beef industry, pathogen detection must be rapid, particularly for highly perishable products such as fresh ground beef. The VIDAS phage assay was shown to be a valuable tool for detection of low level contamination of *E. coli* O157:H7 in composite raw ground beef samples of up to 375g with increased sensitivity and a faster time to result compared to real time PCR. The increased sensitivity is translated into important customer benefits such as better management of the production process and faster release of finished products.

Inocula	Sample portion	Enrichment broth volume	Sample to broth ratio
3-7 CFU/25g	25g	225ml	1/10 th
1-8 CFU/75g	75g	225ml	1/4 th
2-8 CFU/375g	375g	1125ml	1/4 th

5 *E. coli* O157:H7 strains were inoculated separately in triplicate and in a random fashion (15 tests)

P4-18

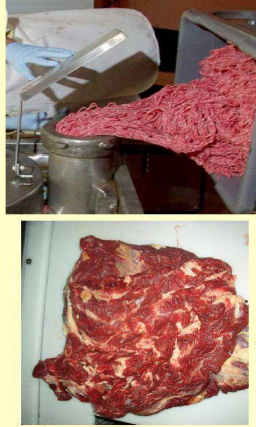


INTRODUCTION

Most commercial detection kits for *E. coli* O157:H7 have been validated for testing 25 g samples. This sampling size does not provide meaningful results for large batches of ground beef which may be contaminated at very low levels. To better meet desired food safety objectives and to allow a more statistically representative sampling protocol, the testing of 375 g composite sample has been recommended. However, high microbial content foods can challenge the robustness and sensitivity of detection methods due to low target to non target ratios. Throughout billions of years phage have developed strategies to recognize specific structural elements that are indispensable for binding to their host. Novel bacteriophage derived recombinant proteins to *E. coli* O157:H7 were suggested as an ideal tool for developing sensitive and specific detection assays. This study was designed to compare the sensitivity of the novel VIDAS *E. coli* O157:H7 phage ligand ELFA with a commercial PCR kit, in detecting low contamination levels of *E. coli* O157:H7 for different sample sizes (25, 75, and 375g) of raw ground beef and trimmings.

Novel Phage Ligand Based Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) For Same Day Detection Of *E. coli* O157:H7 In Composite Samples Of Raw Ground Beef And Trimmings

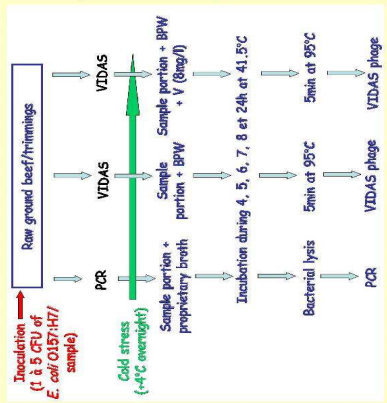
C. Vernozy-Rozand¹, M. Bouvier¹, A. Gleizal¹, F. Savoye¹ and D. Thevenot²
¹Unité de Microbiologie Alimentaire et Préventionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.



URL: http://www.foodonbiology.com/ground-beef_350.jpg

Sample size	Enrichment duration (hours)								
	4	5	6	7	8	24	Trimmings		
Raw ground beef	PCR		1/15	6/15	11/15	16/15	19/15	19/15	75g
	VIDAS		6/15	15/15	19/15	19/15	19/15	19/15	375g
	PHAGE		3/15	14/15	19/15	19/15	19/15	19/15	
	PCR		0/15	0/15	1/15	0/15	1/15	2/15	
	VIDAS		2/15	8/15	14/15	19/15	19/15	19/15	
	PHAGE		1/15	12/15	19/15	19/15	19/15	19/15	
	PCR		ND	ND	0/15	2/15	0/15	6/15	
	PHAGE		ND	ND	0/15	0/15	8/15	15/15	
Trimmings	PCR		ND	ND	0/15	4/15	19/15	19/15	100%
	VIDAS		ND	ND	5/15	ND	6/15	6/15	100%
	PHAGE		ND	ND	0/15	ND	19/15	19/15	100%
	PCR		ND	ND	ND	ND	19/15	19/15	100%
	VIDAS		ND	ND	ND	ND	19/15	19/15	100%
	PHAGE		ND	ND	ND	ND	19/15	19/15	100%
	PCR		ND	ND	ND	ND	19/15	19/15	100%
	PHAGE		ND	ND	ND	ND	19/15	19/15	100%
Commercial PCR		100%	100%	6.8%	13.3%	0%	40%	53.3%	

RESULTS



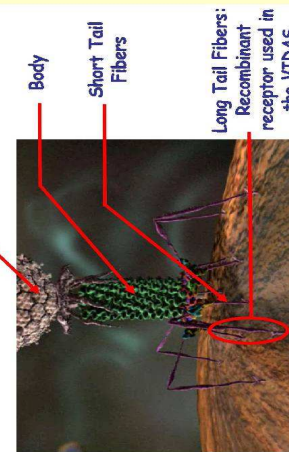
BPW: Buffered Peptone Water, V: vancomycin

DISCUSSION

The kinetic studies clearly showed the shortest incubation times which allowed optimum detection of *E. coli* O157:H7 with VIDAS phage assay. Indeed, for 25g samples of raw ground beef, a 6 hr enrichment was sufficient to give equivalent results to the 24h incubation period. For 75g and 375g of raw ground beef and 75g trimmings, an 8 hr enrichment gave the same number of positive samples as the 24 hr final test point. The increased robustness of the new phage based technology compared to the commercial PCR method, when challenged with a higher concentration of matrix to broth ratio (1/4 versus 1/10) is probably due to the very efficient binding of the phage recombinant protein which underlies the high selective evolutionary pressure.

CONCLUSION

In the beef industry, pathogen detection must be rapid, particularly for highly perishable products such as fresh ground beef. The highly efficient host recognition mechanisms of the phage recombinant protein used in the ELFA assay has shown to be a valuable tool for detection of low level contamination of *E. coli* O157:H7 in composite raw ground beef and trimmings up to 375g with increased sensitivity and a faster time to result compared to the commercial PCR kit used. The increased sensitivity is translated into important customer benefits such as better management of the production process and faster release of perishable finished products.




From: www.justiseyet.com

Sample	Inocula	Sample portion	Enrichment broth volume	Sample to broth ratio
Raw ground beef	3-7 CFU/25g	25g	225ml	1/10 th
	1-8 CFU/75g	75g	225ml	1/4 th
	2-8 CFU/375g	375g	1125ml	1/4 th
Trimmings	3-6 CFU/75g	75g	225ml	1/4 th

5 *E. coli* O157:H7 strains were inoculated separately in triplicate and in a random fashion (15 tests)

Annexe 7: Novel phage ligand based enzyme linked fluorescent assay for same day detection of *E.coli* O157:H7 in environment and feed samples. C. Vernozy-Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal, F. Savoye, D. Thevenot.

P4-17



http://www.researchgate.net/publication/25661399

INTRODUCTION

E. coli O157:H7 is one of the most important foodborne human pathogens of animal origin. Cattle are generally considered the major reservoir for this organism. This organism can be transported from feed lots or through storm water after heavy rainfall and washing of infected manure which subsequently contaminates ground water and soil.

This study was designed to compare the sensitivity of the VIDAS phage ELFA assay with a commercial PCR kit for detecting low contaminations of *E.coli* O157:H7 in environmental and feed samples including soil, bovine faeces, hay and dehydrated feed.

RESULTS

BOVINE FAECES

Detection	Broth	Incubation time (hours)		
		6	8	24
Commercial PCR	Proprietary broth	0%	20%	0%
VIDAS PHAGE positive results	EPT mTSB+N EPT+V EPT+VCC	0%	100%	100%

SOIL

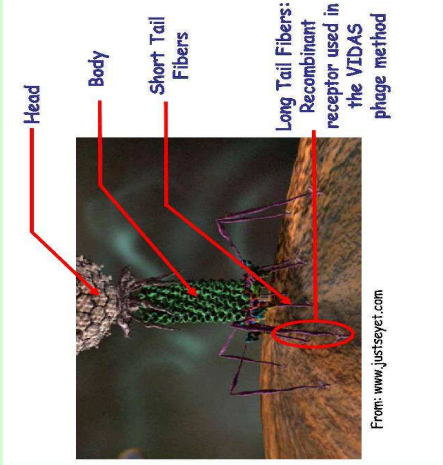
Detection	Bouillon	Incubation time (hours)		
		6	8	24
Commercial PCR	Proprietary broth	0%	0%	0%
VIDAS PHAGE positive results	EPT mTSB+N EPT+V EPT+VCC	100%	100%	100%

HAY

Detection	Bouillon	Incubation time (hours)		
		6	8	24
Commercial PCR	Proprietary broth	100%	100%	100%
VIDAS PHAGE positive results	EPT mTSB+N EPT+V EPT+VCC	100%	100%	100%

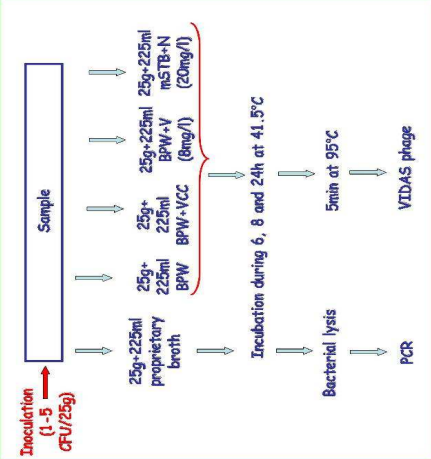
DEHYDRATED FEED

Detection	Bouillon	Incubation time (hours)		
		6	8	24
Commercial PCR	Proprietary broth	0%	0%	0%
VIDAS PHAGE positive results	EPT mTSB+N EPT+V EPT+VCC	100%	100%	100%



From: www.justsayet.com

METHOD



DISCUSSION

The kinetic studies showed the shortest incubation time which allowed optimum detection. Bovine faeces, feed (hay and dehydrated feed) and soil artificially contaminated were positive by the phage ELFA assay after only a 6 hr enrichment. The PCR method rarely detected the pathogen from the bovine faeces, even after 18-24h enrichment and was not able to give any positive result with the inoculated soil and dehydrated feed samples.

CONCLUSION

The highly efficient host recognizing mechanisms of the phage ligand ELFA is a valuable tool for detection of low level contamination of *E.coli* O157:H7 in environmental and feed samples.


3 *E. coli* O157:H7 strains were inoculated separately in triplicate and in a random fashion (9 tests)

BPM, Buffered Peptone Water; VCC, Vancomycin, Colistatin, Cefixim, V, Vancomycin, N, Novobiocin.

D. Thevenot*, M. Bouvier*, A. Gleizal*, F. Savoye* and C. Vernozy-Rozand**
* Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
** Presenting author.

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Annexe 9: Novel Phage Immuno concentration assay for isolation of *E.coli* O26, O103, O111, O145 and O157. F.Savoie, M.Bouvier, JL.Pittet, C.Aguilhon D.Thevenot.



Novel phage immuno-concentration assay for isolation of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157

F. Savoie^a, M. Bouvier^a, J.-L. Pittet^b, C. Aguilhon^a and D. Thevenot^a
^a Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 1 av. Bourgelat, 69 280 Marcy L'Etoile, France. Tel: 3347882951, Fax: 33478872649, email: f.savoie@vetagro-sup.fr
^b Biomérieux, R&D Industrie, avenue Marcel Merieux, 69280 Marcy L'Etoile, France.
 * presenting author.

Introduction.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) that cause hemorrhagic diarrhoeal disease and Haemolytic and Uremic Syndrome are associated with some predominant serotypes. *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157 are the five major serogroups defined by ANSES (French agency for food, environmental and occupational health safety) as being most often associated with foodborne infections. Their high virulence status means that absence of the pathogenic *E. coli* strains must be guaranteed to ensure a safe release of foods.

An efficient detection protocol of these pathogens is therefore essential for the food industry. Detection protocol consists of four steps: sample preparation, enrichment step, detection and confirmation. Among the various steps of this protocol, detection and confirmation are essential steps (Fig.1).

Purpose.

This study was designed to develop and optimize automated VTDAS immuno-concentration of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 (VTDAS ESPT) with the use of recombinant phage proteins for capture. The goal of the test is to allow sample preparation of enriched food products to facilitate further detection of pathogenic strains and reduce the number of non relevant positive reactions.

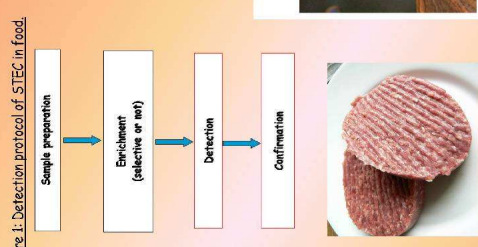


Figure 1: Detection protocol of STEC in food.

Method.

This study was designed to evaluate the sensitivity of this new method. Assay was realised on 50 pure culture strains (*E. coli* O157, O26, O103, O111, O145, STEC and non-STEC). The limit of detection was determined using meat products enriched and then artificially spiked at different levels (10^1 to 10^7 CFU/ml). The spiked enrichments were then immuno concentrated with the VTDAS ESPT and the release suspensions were plated onto ChromID *E. coli* for detection (fig 2).

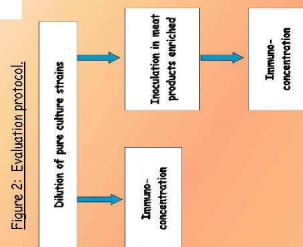


Figure 2: Evaluation protocol.

Results.

The inclusivity study clearly showed that the assay is very sensitive for detection of the targeted strains. The limit of detection determined by serial dilution of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 cultures was found to be at least 10^4 cells/mL after enrichment (Tab1). The test was shown to be sensitive enough for isolation of very low levels of stressed strains (1 to 5 CFU/25g) in artificially contaminated foods.

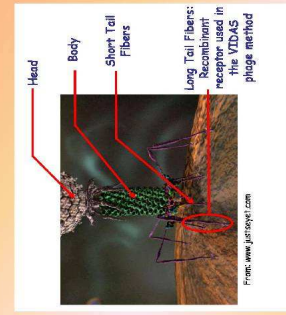


Table 1: Performances of novel phage immuno-concentration assay.

Serogroup	O26	O103	O111	O145	O157
Immuno-concentration sensitivity of pure culture strains (CFU/mL)	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
Immuno-concentration sensitivity in enrichment broth (CFU/mL)	10^4	10^5	10^5	10^4	10^5

Significance.

This study has demonstrated that the VTDAS phage ESPT is a promising tool to isolate *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 from food in a single assay, prior to establishing their pathogenic status with a PCR assay or to facilitate their identification on selective agar plates. This automated method will provide obvious technical and economic advantages to the food industry for routine testing. The increased sensitivity is translated into important customer benefits such as better management of the production process and faster release of finished products.

Annexe 10: Immuno concentration assay for isolation of STEC strains. F.Savoie, M.Bouvier, J.L.Pittet, C.Aguilhon D.Thevenot.

Ref: 141196

Immuno-Concentration Assay For Isolation Of STEC strains



F. Savoie^a, M. Bouvier^a, J-L. Pittet^b, C. Aguilhon^b and D. Thevenot^a.

^a Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 1 av Bourgelat, 69 280 Marcy L'Etoile. France.

Tel: 3347882551, Fax: 33478872669, email: f.savoie@vetagro-sup.fr

^b BioMérieux, R&D Industrie, avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy L'Etoile. France.



.Introduction.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) that cause hemorrhagic diarrhoeal disease and Haemolytic and Uremic Syndrome are associated with some predominant serotypes. *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157 are the five major serogroups defined by ANSES (French agency for food, environmental and occupational health safety) as being most often associated with foodborne infections. Their high virulence status means that absence of the pathogenic *E. coli* strains must be guaranteed to ensure a safe release of foods.

An efficient detection protocol of these pathogens is therefore essential for the food industry. Detection protocol consists of four steps: sample preparation, enrichment step, detection and confirmation. Among the various steps of this protocol, detection and confirmation are essential steps (Fig.1).

.Objectives.

This study was designed to develop and optimize automated VIDAS immuno-concentration of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 (VIDAS ESPT) with the use of recombinant phage proteins for capture. The goal of the test is to allow sample preparation of enriched food products to facilitate further detection and/or confirmation of pathogenic strains and reduce the number of non relevant positive reactions (Fig.2).

.Method.

This study was designed to evaluate the sensitivity of this new method. On the one hand, assays were realised on 50 pure culture strains (*E. coli* O157, O26, O103, O111, O145, STEC and non-STEC) cultured on buffered peptone water (BPW) for 24h at 37°C. On the other hand, the limit of detection was determined using meat products enriched in BPW and then artificially spiked at different levels (10^1 to 10^7 CFU/ml). The spiked enrichments were then immuno concentrated with the VIDAS ESPT and the release suspensions were used for two assays. On the one hand, 100 µL were plated onto ChromID *E. coli* for detection, and on the other hand, 300 µL were used for detection of virulence factors by RT-PCR method (fig 3).



.Discussion / Conclusions.

This study has demonstrated that the VIDAS phage ESPT is a promising tool to isolate *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 from food in a single assay, prior to establishing their pathogenic status with a PCR assay or to facilitate their identification on selective agar plates. This automated method will provide obvious technical and economic advantages to the food industry for routine testing. The increased sensitivity is translated into important customer benefits such as better management of the production process and faster release of finished products.

Figure 1: Detection protocol of STEC in food.

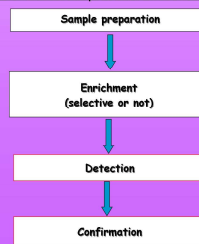
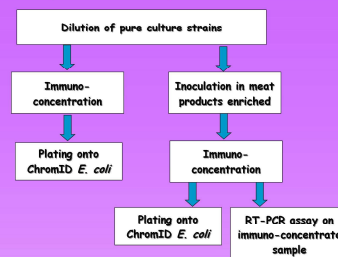


Figure 2: To the left: plate after VIDAS Immuno-concentration and to the right: plate without immuno-concentration.



Figure 3: Evaluation protocol.



.Results.

This study clearly showed that the assay is very sensitive for detection of the targeted strains: the limit of detection determined by serial dilution of *E. coli* O26, O103, O111, O145 and O157 cultures was found to be at least 10^4 cells/mL after enrichment (Tabl.1). The test was shown to be sensitive enough for isolation of very low levels of cold-adapted strains (1 to 5 CFU/25g) in artificially contaminated foods. About detection of virulence factors by RT-PCR in immuno-concentrate samples, the limit of detection was found to be 10^3 - 10^4 cells/mL both for the search of *eae* gene than for *stx* genes (Tabl.2). More experimentations have to be performed in order to validate these results.

Table 1: Sensitivity of novel phage immuno-concentration assay.

Serogroup	O26	O103	O111	O145	O157
Immuno-concentration sensitivity of pure culture strains(CFU/mL)	10^3	10^2	10^2	10^2	10^2
Immuno-concentration sensitivity in enrichment broth (CFU/mL)	10^4	10^3	10^3	10^4	10^3

Table 2: Performances of RT-PCR assay for detection of virulence factor (*eae*, *stx1* and *stx2*) in immuno-concentrate samples.

Serogroup	O26	O103	O111	O145	O157
<i>eae</i> gene detection sensitivity by RT-PCR method in immuno-concentrate sample (CFU/mL)	10^3	10^3	10^3	10^3	10^2
<i>stx1</i> and <i>stx2</i> gene detection sensitivity by RT-PCR method in immuno-concentrate sample(CFU/mL)	10^4	10^3	10^3	10^4	10^2

Références bibliographiques

Abdul-Raouf, U. M., Beuchat L. R, and. Ammar M. S (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol* 59:2364-2368.

Acheson, D. W., Reidl J., Zhang X., Keusch G. T., Mekalanos J. J., and Waldor M. K. (1998) *In vivo* transduction with shiga toxin 1-encoding phage. *Infect Immun* 66:4496-4498.

Ackers, M. L., Mahon B. E., Leahy E, Goode B., Damrow T. Hayes P. S, Bibb W. F., Rice D. H., Barrett T. J., Hutwagner L., Griffin P. M., and Slutsker L. (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* 177:1588-1593.

Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T., et Birkhead, G. (1997) Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect* 119: 1-8.

Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A. et Cheasty, T. (1999) Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch Dis Child* 81: 60-63.

Allaby, M.A. et Mayon-White, R. (1995) *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun Dis Rep CDR Rev* 5: 4-6.

Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W. et Karch, H. (2001) *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill* 6: 147-151.

Aminul Islam M., Heuvelink A.E., Talukder K.A., de Boer E. (2006) Immunoconcentration of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 151-156.

Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. et Suassuna, I. (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 28: 49-57.

Arocha MM., Mcvey M., Loder SD., Rupnow JH., Bullerman L. (1992). Behaviour of haemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture of cottage cheese. *J Food Protect*, 55 : 379-381.

Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Tache, J. and Derzelle, S. (2009) Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett Appl Microbiol* 48, 554-559.

Auvray, F., Lecureuil, C., Tache, J., Leclerc, V., Deperrois, V. and Lombard, B. (2007) Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett Appl Microbiol* 45, 646-651.

- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L. (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ* 49: 1-21.
- Baylis C.L. (2008) Growth of pure cultures of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1259-1265.
- Begum, D. and Jackson, M.P. (1995) Direct detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 9, 259-264.
- Belanger, S.D., Boissinot, M., Menard, C., Picard, F.J. and Bergeron, M.G. (2002) Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J Clin Microbiol* 40, 1436-1440.
- Belongia, E.A., Osterholm, M.T., Soler, J.T., Ammend, D.A., Braun, J.E. et MacDonald, K.L. (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *Jama* 269: 883-888.
- Benz, I. et Schmidt, M.A. (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6: 1539-1546.
- Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. et Martin, C. (2001) Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* 39: 3060-3065.
- Besser, R. E., Lett S. M., Weber J. T., Doyle M. P., Barrett T. J., Wells J. G., and Griffin P. M. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269:2217-2220.
- Beumer, R. R. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food microbiol* 13:333-340.
- 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 Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 267:576-588.
- Beutin, L., Montenegro M. A., Orskov I., Orskov F., Prada J., Zimmermann S., and Stephan R.. (1989) Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27:2559-2564.
- Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K. (1996) Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J Clin Microbiol* 34, 2812-2814.

- Beutin, L., Bulte, M., Weber, A., Zimmermann, S. et Gleier, K. (2000) Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect* 125: 47-54.
- Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K. (2002) Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42, 1-8.
- Beutin, L., Steinruck, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsh, G. and Appel, B. (2007) Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol.* 102: 630-639.
- K. Bhan, Levine M. M., and Fasano A.. (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 173:1019-1022.
- Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M.A., Khakhria, R., Janda, J., Blahova, K. and Karch, H. (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 36, 2135-2137.
- Bitzan, M., Ludwig, K., Klemm, M., König, H., Buren, J. et Müller-Wiefel, D.E. (1993) The role of *Escherichia coli* O 157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicentre study. *Epidemiol Infect* 110: 183-196.
- 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. *MMWR Surveill Summ* 53: 23-45.
- Boerlin P., Chen S., Colbourne J.K., Johnson R., De Grandis S., Gyles C. (1998) Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in Shiga-toxin producing *E. coli*. *Infection and Immunity* 66, 2553-2561.
- 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* 30: 81-88.
- Bolton, F.J., Chapman, P.A., Farthing, M., Mani-Saada, J., O'Brien, S.J., Painter, M.J., Salmon, R.L., Sebastian, M., Smith, H.R., Trevena, B., and Wood, M.J. (2000) Guidelines for the control of infection with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Communicable Disease and Public Health* 3: 14- 23.

- Bosilevac, J.M., Guerini, M.N., Brichta-Harhay, D.M., Arthur, T.M., Koohmaraie, M., (2007). Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. *Journal of Food Protection* 70 (2), 440–449.
- Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Ilef, D., Cuvelier, B., Capek, I., Tribout, B., Bingen, E. et Piussan, C. (1997) Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 11: 36-39.
- Bouvet J., Vernozy-Rozand C. (2000) Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* vérotoxiques (STEC) et de *E. coli* O157:H7 dans les aliments. *Rev. Med. Vet.*151, 907-914.
- Brenner, D., Fanning, G., Miklos, G. et Steigerwalt, A. (1973) Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* 23: 1-7.
- Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. and Dordjevic, S.P. (2003) Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2 EDL933 and/or stx2vhb subtypes. *J Clin Microbiol.* 41: 2716-2722.
- Brewster, D.H., Brown, M.I., Robertson, D., Houghton, G.L., Bimson, J. et Sharp, J.C. (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* 112: 441-447.
- Brian, M.J., Frosolono, M., Murray, B.E., Miranda, A., Lopez, E.L., Gomez, H.F. and Cleary, T.G. (1992). Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 30, 1801-1806.
- Brunder, W., Schmidt H., and Karch H. (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142:3305-3315.
- Brunder, W., Schmidt H., and Karch H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24:767-778.
- Buchanan, R. L., and Bagi L. K. (1997). Microbial competition : effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *J Food Prot* 60:254-261.
- Buchanan, R.L., and Klawitter, L.A. (1992) The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology* 9: 185- 196.
- Burland, V., Shao Y., Perna N. T., Plunkett G., Sofia H. J., and Blattner F. R.. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26:4196-4204.

Cagney C., Crowley H., Duffy G., Sheridan J.J., O'Brien S., Carney E., Anderson W., McDowell D.A., Blair I.S., Bishop R.H. (2004) Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. *Food Microbiology* 21: 203–212.

Calderwood, S., Akeson D., Keusch G., Barrett T., and Griffin P. (1996) Proposed New Nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62:118-119.

Caprioli, A. et Tozzi, A.E. (1998) Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC. Am Soc for Microbiol, 38-48.

Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., Farina, C., Goglio, A., Gianviti, A. et Rizzoni, G. 1994. Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 169: 208-211.

Carlin, F., Nguyen C., and Morris C.. 1996. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *J Food Prot* 59:698-703.

Carney, E., O'Brien S. B., Sheridan J., McDowell D., Blair I., and Duffy G. (2006). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food microbiol* 23:52-59.

Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoit, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P. et Grimont, P. (1993) Ecllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bull Epidemiol Hebdomadaire* 48: 222-224.

CDC. 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June (1998). *MMWR Morb Mortal Wkly* 49:911-913.

CDC. 2006. *E. coli* O157:H7 outbreak from fresh spinach. Not Published

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* 54: 1-37.

Chalmers, R.M., Aird, H. et Bolton, F.J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 88: 124S-132S.

- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., Harkin, M.A., (2000). A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiology and Infection* 124, 207–213.
- Chen, S., Xu, R., Yee, A., Wu, K.Y., Wang, C.N., Read, S. and De Grandis, S.A. (1998) An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl Environ Microbiol* 64, 4210-4216.
- Cheville, A. M., Arnold K. W., Buchrieser C., Cheng C. M., and Kaspar C. W. (1996) rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 62:1822-1824.
- Chinen, I., Tanaro, J.D., Miliwebsky, E., Lound, L.H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E., Rivas, M., (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *Journal of Food Protection* 64 (9), 1346–1351.
- Choi, S. H., Baumler D. J., and Kaspar C. W. (2000) Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 66:3911-3916.
- Cieslak, P. R., Barrett T. J., Griffin P. M., Gensheimer K. F., Beckett G., Buffington J., and Smith M. G. (1993). *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 342:367.
- Cody, S. H., M. K. Glynn, J. A. Farrar, K. L. Cairns, P. M. Griffin, J. Kobayashi, M. Fyfe, R. Hoffman, A. S. King, J. H. Lewis, B. Swaminathan, R. G. Bryant, and D. J. and Vugia. (1999) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med* 130:202-209.
- Coia, J.E. (1998) Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 20: 1-9.
- Cookson, S.T. et Nataro, J.P. (1996) Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol* 21: 421-434.
- Cornick, N. A., Helgerson A. F., Mai V., Ritchie J. M., and Acheson D. W. (2006). *In vivo* transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 72:5086-5088.
- 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* 18: 286-288.
- Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., Nauta, J. et Wolff, E.D. (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome-source contaminated swimming water? *Clin Nephrol* 46: 45-49.

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* 15: 243-262.

Creusburg K. et Schmidt H. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their bacteriophages as a model for the analysis of virulence and stress response of a food-borne pathogen. [Berl Munch Tierarztl Wochenschr.](#) 120(7-8):288-95.

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* 347: 555-560.

D'Amico, D.J., Druart, M.J. and Donnelly C.W. (2010) Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J. Food Prot.* Vol. 73, No. 12, 2217-2224.

Davies AR., Slade A., Blood R.M., Gibbs PA. (1992). Effect of temperature and pH value on the growth of verotoxigenic *E.coli* Leatherhead Food Research Association., *Reasearch Report*, N 691

Decludt, B., Bouvet P., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Grimont P. A., Hubert B., DeVinney, R., Gauthier A., Abe A., and Finlay B. B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* 55:961-976.

Del-Campo, J., Carlin F., and Nguyen C. (2001) Effects of epiphytic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *J Food Prot* 64:721-724.

Derval, I. (2001) The epidemiology of verocytotoxigenic *E. coli* O157:H7 in Ireland. In *Epidemiology of Verototoxigenic E.coli organised by EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y. and McDowell, D. (eds.) Malahide, Dublin, Ireland 8-10th February 2001.

DeVinney, R., Gauthier A., Abe A., and Finlay B. B. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* 55:961-976.

Devlieghere, F., Geeraerd A. H., Versyck K. J., Vandewaetere B., Impe J. V., and Debevere J. (2001) Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food microbiology* 18:53-66.

Dineen, S.S., Takeuchi K., Soucah, J.E. and Boor, K.J. (1998) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J. Food Prot.* 61: 1602-1608.

Donnenberg, M. S., Tzipori S., McKee M. L., O'Brien A.D., Alroy J., and Kaper J. B. (1993) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 92:1418-1424.

Doorduyn, Y., de Jager, C.M., Dan Der Zwaluw, W.K., Friesema, I.H., Heuvelink, A.E., de Boer, E., Wannet, W.J. et Van Duynhoven, Y.T. (2006) Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September- October 2005. *Euro Surveill* 11: 182-185.

Doyle MP., Schoeni, JL. (1984) Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol.* 48(4):855-6.

Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* 12: 289-301.

Drysdale, M., MacRae, M., Stratchen, N.J., Reid, T.M. and Ogden, L.D. (2004) The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J. Appl. Microbiol.* 97, 220-224.

Dziuban, E.J., Liang, J.L., Craun, G.F., Hill, V., Yu, P.A., Painter, J., Moore, M.R., Calderon, R.L., Roy, S.L. et Beach, M.J. (2006) Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ* 55: 1-30.

Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., de Valk, H. et Vernozy-Rozand, C. (2006a) Shigatoxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France 2005. In 6th International Symposium on STEC, Melbourne.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. et Vernozy-Rozand, C. (2006b) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* 134: 143-146.

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* 16: 885-889.

Fantelli, K., Stephan, R., (2001). Prevalence and characteristics of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 70, 63–69.

Feng, P., Lampel K. A., Karch H., and Whittam T. S. (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 177:1750-1753.

- Fitzmaurice J., Duffy G., Kilbride B., Sheridan J.J., Carroll C., Maher M. (2004) Comparison of a membrane surface adhesion recovery method with an IMS method for use in a polymerase chain reaction method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. *J. Microbiol. Meth.* 59: 243-252.
- Fong, J. S., de Chadarevian J. P., and Kaplan B. S. (1982) Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Am* 29:835-856.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Miyamoto, T. and Liu, Y. (2009) PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes. *Foodborne Pathog Dis* 6, 605-611.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Strobaugh, T.P., Jr. and Chen, C.Y. (2005) DNA sequence of the *Escherichia coli* O103 O antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Can J Microbiol* 51, 515-522.
- Fremaux, B., Raynaud S., Beutin L., and Vernozy-Rozand C. (2006) Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol* 117:180-191.
- 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* 29: 298-303.
- Fu Z., Rogelj S., Kieft T.L. (2005) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 47-57.
- Gannon, V. P., Teerling C., Masri S. A., and Gyles C. L. (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* 136:1125-1135.
- Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M. et Zimmerhackl, L.B. (2002) Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis* 186: 493-500.
- Ghebru, H. (1988) Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise es sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes.
- Glass, K., Loeffelholz J., Ford J. and Doyle M. (1992) Fate of *Escherichia coli*O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol* 58:2513-2516.
- Gonthier, A., Guerin-Fauble, V., Tilly, B., and Delignette-Muller, M.L. (2001) Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett Appl Microbiol* 33: 352-356.
- Gore H.M., Wakeman C.A., Hull R.M., McKillip J.L. (2003) *Bioch. Bioph. Res. Com.*, 311, 386-390.

Grau, F. H., and Vanderline P.B. (1992) Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J Food Prot* 55:4-7.

Griffin, P.M., Olmstead, L.C. et Petras, R.E. (1990) *Escherichia coli* O157:H7- associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* 99: 142-149.

Griffin, P., and Tauxe, RV. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13:60-98.

Griffin, P.M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infectious of the Gastrointestinal Tract*/Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Radvin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, 739-758.

Griffin, P.M. (1998) Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United-States. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC:. Am Soc for Microbiol, 15-22.

Griffin, P., Mead, P., Van Gilder, T., Hunter, S., Strockbine, N. et Tauxe, R. (2000) Shiga Toxin-producing *E. coli* infections in the United States: current status and challenges. In: 4th International Symposium and Workshop on "Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections (october 29-November 2, 2000), Kyoto, Japan.

Grimont, P. (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*, 6-10.

Guerini, M. N., Arthur T. M., Shackelford S. D., and Koohmaraie M. (2006) Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. *J Food Prot* 69:1007-1011.

Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 85:E45-62.

Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., and Grimont, F. (2002) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique, chez les enfants de moins de 15 ans, en France en 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 29/2002: 145-148.

Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., Grimont, F. et le réseau des néphrologues pédiatres, (2003) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, soumis pour publication.

Herold, S., Karch H., and Schmidt H. (2004). Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 294:115-121.

- Hilborn, E. D., Mermin J. H., Mshar P. A., Hadler J. L., Voetsch A., Wojtkunski C., Swartz M., Mshar R., Lambert-Fair M. A., Farrar J. A., Glynn M. K., and Slutsker L. (1999) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med* 159:1758-1764.
- Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E. et Kangesu, E. (1996) An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev* 6: 33-36.
- Hofmann, S. L. (1993) Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci* 306:398-406.
- Holme, R. (2003) Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol* 47: 1-6.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A. and Fach, P. (2004) Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *J Appl Microbiol* 96, 221-222.
- Hurley, B. P., Jacewicz M., Thorpe C. M., Lincicome L. L., King A. J., Keusch G. T., and Acheson D. W. (1999) Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 67:6670-6677.
- Hussein, H.S. and Sakuma, T. (2005) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. *J Food Prot* 68, 199-207.
- Hussein, H.S., Bollinger L.M., Hall M.R. (2008) Growth and enrichment medium for detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle feces. *J. Food Prot.*, Vol. 71, Issue: 5: 927-933.
- Hussein, H. S., and Bollinger L. M.. (2008). Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:227-244.
- Ismaili, A., Philpott D. J., Dytoc M. T., and Sherman P. M. (1995) Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63:3316-3326.
- Iyoda, S., Tamura K., Itoh K., Izumiya H., Ueno N., Nagata K., Togo M., Terajima J., and Watanabe H. (2000) Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiol Lett* 191:7-10.
- 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* 120: 17-20.
- Jameson, J. E. 1962. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J Hyg (Lond)* 60:193-207.

Jarvis, K. G., and Kaper J. B.. (1996) Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64:4826-4829.

Jenkins, C., Evans, J., Chart, H., Willshaw, G.A. and Frankel, G. (2008) *Escherichia coli* serogroup O26--a new look at an old adversary. *J Appl Microbiol* 104, 14-25.

Jenkins, C., Pearce, M.C., Smith, A.W., Knight, H.I., Shaw, D.J., Cheasty, T., Foster, G., Gunn, G.J., Dougan, G., Smith, H.R. and Frankel, G. (2003) Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Lett Appl Microbiol* 37, 207-212.

Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. et Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7839-7843.

Jerse, A. E., and Kaper J. B.. (1991) The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* 59:4302-4309.

Kanki M., [Seto K.](#), [Sakata J.](#), [Harada T.](#), [Kumeda Y](#) (2009) Simultaneous Enrichment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and O26 and Salmonella in Food Samples Using Universal Preenrichment Broth. *J. Food Prot.*, Vol. 71, Issue 10: 2065-2070.

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. *J Clin Microbiol* 33: 1602-1605.

Karch, H., Janetzki-Mittmann C., Aleksic S., and Datz M. (1996) Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 34:516-519.

Karmali, M.A., Petric, M. et Bielaszewska, M. (1999) Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 37: 396-399.

Karmali, M. A., Steele B. T., Petric M., and Lim C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1:619-620.

Kassenborgh, H., Hedberg, C., Evans, M., Chin, G., Fiorentino, T.R., Vugia, D., Bardsley, M., Slutsker, L. et Griffin, P.M. (1998) Case-control study of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections in 5 Foodnet Sites. In: 1st International Conference on Emerging Infectious Diseases, March 1998 Atlanta, Georgia-USA.

Kauffmann, F. (1947) The serology of the *E. coli* group. *J Immun* 57: 71-100.

Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A. et Fleming, D.W. (1994) A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331: 579-584.

Kehl, K.S., Havens, P., Behnke, C.E. and Acheson, D.W. (1997) Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 35, 2051-2054.

Kenny, B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D. J., Frey E. A., and Finlay B. B.. (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I. et Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775-779.

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* 88:177-179.

[Kutyavin IV](#), [Afonina IA](#), [Mills A](#), [Gorn VV](#), [Lukhtanov EA](#), [Belousov ES](#), [Singer MJ](#), [Walburger DK](#), [Lokhov SG](#), [Gall AA](#), [Dempcy R](#), [Reed MW](#), [Meyer RB](#), [Hedgpeth J](#). (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. [Nucleic Acids Res.](#) 28(2):655-661.

Lea, N., Lord J. M., and Roberts L. M.. (1999) Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* 145:999-1004.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L. (2002) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ* 51: 1-47.

Le Minor, L., Popoff, M.Y. et Bockemuhl, J. (1990) Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 141: 1173-1177.

Lerman, Y., Cohen, D., Gluck, A., Ohad, E. et Sechter, I. (1992) A cluster of cases of *Escherichia coli* O157 infection in a day-care center in a communal settlement (Kibbutz) in Israel. *J Clin Microbiol* 30: 520-521.

Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A. and Yam, W.C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol.* 69: 7549-7553.

Levine, M.M. et Edelman, R. (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews* 6: 31-51.

Levine, M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* 155:377-389.

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* 55: 31-65.

Lin, J., Smith M. P., Chapin K. C., Baik H. S., Bennett G. N., and Foster J. W. (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62:3094-3100.

Lindgren, S. W., Melton A. R., and O'Brien A. D. (1993) Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* 61:3832-3842.

Lindqvist, R., Antonsson, A.K., Norling, B., Persson, L., Ekström, A.-C.L., Fa'ger, U., Eriksson, E., Löfdahl, S., Norberg, P., (1998). The prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in beef in Sweden determined by PCR assays and an immuno-magnetic separation (IMS) method. *Food Microbiology* 15, 591–601.

Lingwood, C. A., Law H., Richardson S., Petric M., Brunton J. L., De Grandis S., and Karmali M. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 262:8834-8839.

Loirat, C., Baudouin V., Sonsino E., Mariani-Kurkdjian P., and Elion J. (1992) Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. In *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker*. Flammarion-Médecine-Sciences (ed)-Paris:pp133-158.

Loirat C., and a. S. d. N. P. Pédiatrique. (2000) Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect* 124:215-220.

Lopez, E.L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E., Ashkenazi, S., Rubeglio, E., Woloj, M., Vasquez, M., et al. (1989) Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* 160: 469-475.

Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K., Rahn, K., Borczyk, A. et Lior, H. (1999) Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect* 123: 17-24.

Ludwig, K., Petric, M., Blanchette, V. et Karmali, M. (1998) Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin Infect Dis* 27: 660-661.

- MacDonald, I.A., Gould, I.M., and Curnow, J. (1996) Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157: a 3-year prospective study. *Epidemiol Infect* 116: 279-284.
- Mackenzie, A.M., Lebel, P., Orrbine, E., Rowe, P.C., Hyde, L., Chan, F., Johnson, W. and McLaine, P.N. (1998) Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. The SYNSORB Pk Study investigators. *J Clin Microbiol* 36, 1608-1611.
- Maher, M. M., Jordan, K.N., Upton, M.E. and Coffey, A. (2001) Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 90: 201-207.
- Mailles, A., Mariani-Kurkdjian P., Vernozy-Rozand C., Grimont F., Pihier N., Bingen E., Horen B., Doireau V., Llanas B., Espié E., and Vaillant V. (2006). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France 2005. 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
- Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Greally, 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* 10, 51222-51223.
- Martin, D.R., Uhler, P.M., Okrend, A.J.G. et Chill, J.Y. (1994) Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* 57: 70-72.
- Massa, S., Goffredo E., Altieri C., and Natola K. (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Lett Appl Microbiol* 28:89-92.
- 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* 82: 197-203.
- McNamara, A. M. (2003) A survey of Current Industry Protocols for the Detection of *E. coli* O157:H7 in Raw Ground Beef and Raw Beef Trim. Final Report to the National Cattlemen's Beef Association.
- McNamara, A. M., McMahan W. A., Schultz A., Aleo V., Huffman R., Curiale M. and Silliker R. C. (2005) Validation of Composite Sampling for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Beef Trim and Raw Ground beef. Final Report to the National Cattlemen's Beef Association.
- Mechie, S. C., Chapman P. A. and Siddons C. A. (1997) A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect* 118:17-25.

- Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arne, P.D., Cerf, O. et Sanaa, M. (2001) Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* 203: 347-361.
- Michel, P., Wilson, J.B., Martin, S.W., Clarke, R.C., McEwen, S.A., and Gyles, C.L. (1999) Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiol Infect* 122: 193-200.
- Miller, L. G., and Kaspar C. W. (1994) *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot* 57:460-464.
- Milne, L.M., Plom, A., Strudley, I., Pritchard, G.C., Crooks, R., Hall, M., Duckworth, G., Seng, C., Susman, M.D., Kearney, J., Wiggins, R.J., Mouldsdale, M., Cheasty, T. et Willshaw, G.A. (1999) *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* 2: 22-26.
- Min J., Bauemner A.J.(2002) Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Anal. Biochem.*, 303, 186-193.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, JE., Dahbi, G., Lopez, C., Justel, P., Alonso, MP., Echeita, A., Bernardez, MI., Gonzalez, EA. and Blanco, J. (2007). Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 7:13.
- Morabito, S., Karch H., Mariani-Kurkdjian P., Schmidt H., Minelli F., Bingen E. and Caprioli A. (1998) Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 36:840-842.
- 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* 101:83-91.
- Morgan, D., Newman C. P., Hutchinson D. N., Walker A. M., Rowe B., and Majid F. (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* 111:181-187.
- Moschcowitz, E. (1925) An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med* 36:89.
- Moxley, R. A., and Francis D. H. (1986) Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* 53:339-346.

Muniesa, M., Blanco J. E., De Simon M., Serra-Moreno R., Blanch A. R., and Jofre J. (2004). Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150:2959-2971.

Muniesa, M., Recktenwald J., Bielaszewska M., Karch H., and Schmidt H. (2000). Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun* 68:4850-4855.

Murinda, S. E., Nguyen L. T., Ivey S. J., Gillespie B. E., Almeida R. A, Draughon F. A. and Oliver S. P.. (2002) Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12- month survey of dairy farms in east Tennessee. *J Food Prot* 65:752-759.

[Murphy M.](#), [Carroll A.](#), [Walsh C.](#), [Whyte P.](#), [O'Mahony M.](#), [Anderson W.](#), McNamara E., [Fanning S.](#) (2007) Development and assessment of a rapid method to detect *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in retail minced beef. *Int. J. of Hygiene. and Env. Health.* Vol. 210.Issue: 2: 155-161.

Nastasijevic I., Mitrovic R. and Buncic S. (2009) The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science*, Volume 82, Issue 1, Pages 101-105.

Nataro, J. P. and Kaper J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.

Nauta, M.J. and Dufrenne, J. (1999) Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol.* 1: 137 155.

Neaves, P., J. Deacon, and Bell C. (1994) A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int Dairy J* 4:679-696.

Nielsen M. E. and Andersen M.T. (2003) Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.41, No.7, 2884-2893.

O'Brien, A., LaVeck G., Griffin D., and Thompson M. (1980) Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infection and immunity* 30:170-179.

O'Brien, A., LaVeck G., Thompson M., and Formal S. (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146:763-769.

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* 7: 1049-1051.

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* 34: 100-104.

Ogden, I. D., Hepburn N. F. and McRae M. (2001) The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 91:373–379.

[O'Hanlon KA](#), [Catarama TMG](#), [Duffy G](#), [Blair IS](#), [McDowell DA](#) (2004) RAPID detection and quantification of *E-coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96(5): 1013-1023.

Okrend, A. J. G., Rose B. E., and Lattuada C. P. (1990) A research note : use of 5- bromo-4-chloro-3-indoxyl-1-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* 53:941-943.

Orskov, F., Orskov, I. et Villar, J.A. (1987) Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 2: 276.

Park, C.H., Kim, H.J., Hixon, D.L. and Bubert, A. (2003) Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of Shiga toxins in cultures of human stools. *J Clin Microbiol* 41, 2650-2653.

Park, S., Worobo R. W. and Durst R. A. (2001) *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit Rev Biotechnol* 21:27-48.

Parry, S.M. et Salmon, R.L. (1998) Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis* 4: 657-661.

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* 34: 1622-1627.

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* 65:3799-3805.

Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A. and Paton, J.C. (1999) Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 37, 3357-3361.

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* 122: 1-5.

- Pavia, A.T., Nichols, C.R., Green, D.P., Tauxe, R.V., Mottice, S., Greene, K.D., Wells, J.G., Siegler, R.L., Brewer, E.D. et Hannon, D., et al. (1990) Hemolyticuremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 116: 544-551.
- Pearce, M.C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A.W., Knight, H.I., Cheasty, T., Smith, H.R., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., Amyes, S.G. and Frankel, G. (2004) Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Appl Environ Microbiol* 70, 1708-1716.
- Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P. (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7 associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* 18: 185-192.
- Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P. (2005) Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **98** (5): 1162-1168.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. (2007) Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int J Food Microbiol* 113, 284-288.
- Phillips, A. D. and Frankel G. (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* 181:1496-1500.
- Pohl, P. (1993) Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* 137:325-333.
- Poitras E. et Houde A. (2002) La PCR en temps réel : principe et applications. *Reviews in Biology and Biotechnologie*. 2(2) : 2-11.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M. and Herman, L. (2008a) Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol Lett* 282, 124-131.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. and 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* 38, 1023-1031.
- Price, S., Cheng C., Kaspar C., Wright J., DeGraves F., Penfound T., Castanie-Cornet M., and Foster J. (2000) Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 66:632-637.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. et Swerdlow, D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603-609.

- Reid, S. D., Herbelin C. J., Bumbaugh A. C., Selander R. K. and Whittam T. S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406:64-67.
- Reida, P., Wolff, M. et Pohls, H.W. (1994) An outbreak due to *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol* 281: 534-543.
- Reinders, R., De Jonge R., and Evers E. G. (2003) A statistical method to determine whether micro-organisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Food microbiology* 20:297.
- Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyk, A., Spika, J.S., Rahn, K., McFadden, K., Brouwer, A., Copps, A. et al. (1994) Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human--Ontario. *Can Commun Dis Rep* 20: 73-75.
- Rice, E.W., Clark, R.M., and Johnson, C.H. (1999) Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis* 5: 461-463.
- 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., and Cohen M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308:681-685.
- Rippey, S. R., Chandler L. A. and Watkins W. D. (1987) Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shell-fish. *J Food Prot* 50:685-690.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. et Leotta, G.A. (2006) The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. *Medicina (B Aires)* 66 Suppl 3: 27-32.
- 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* 115: 447-454.
- Ross, T., Dalgaard P, and Tienungoon S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62:231-245.
- Rozand C., Feng Peter C.H. (2009) Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an enzyme linked fluorescent assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* Vol.72, No.5, 1078-1081 (4).

- Safaríková M., Safarík I. (2001) Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. *Lett Appl Microbiol.* **33**(1): 36-39.
- Samadpour, M., Kubler, M., Buck, F.C., Depavia, G.A., Mazengia, E., Stewart, J., Yang, P., Alfi, D., (2002). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington. *Journal of Food Protection* 65 (8), 1322–1325.
- Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsshell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., *et al.* (2008) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiol. Infect.* 136: 370-380.
- Savarino, S. J., McVeigh A., Watson J., Cravioto A., Molina J., Echeverria P., Schmidt M., Beutin L., and Karch H. (1995) Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63:1055-1061.
- Scheutz, F., Olesen, B., Engberg, J., Munk Petersen, A., Molbach, K., Schiellerup, P., and Gerner-Schmidt, P. (2001) Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E.coli* (VTEC) from danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. In *Epidemiology of Verototoxigenic E.coli organised by EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y. and McDowell, D. (eds.) Malahide, Dublin, Ireland 8-10 th February 2001.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.M., Lassen, J., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Kapperud, G. and Aavitsland, P. (2008) Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis* 8, 41.
- Schmidt, H., Beutin L., and Karch H.. (1995). Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63:1055-1061
- Schmidt, H., and Karch H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and haemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 34:2364-2367.
- Schuller, S., Frankel, G. et Phillips, A.D. (2004) Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* 6: 289-301.
- Sharp, J. C., Ritchie L. D., Curnow J. and Reid T. M. (1994) High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J Infect* 29:343-350.
- Shinagawa (1997) Correspondance and problem for Enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* 46: 104-112.

- Shukla, R., Slack, R., George, A., Cheasty, T., Rowe, B. et Scutter, J. (1994) *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun Dis Rep CDR Rev* 5: 86-90.
- Siegler, R. L. (1994) Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolyticuremic syndrome. *J Pediatr* 125:511-518.
- Siegler, R.L. (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 42: 1505- 1529.
- Skandamis, P.N. and Nychas, G.J. (2000) Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1646-1653.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G. et Chalmers, R.M. (2006) Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect* 134: 1141-1149.
- Smith, H.R., Rowe, B., Adak, G. et Reilly, W. (1998) Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC. Am Soc for Microbiol, 49-58.
- Smith, H.R. and Scotland, S.M. (1993) ACP Broadsheet 135: January 1993. Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Vero cytotoxin producing strains. *J Clin Pathol* 46, 10-17.
- Soderstrom, A., Lindberg, A. et Andersson, Y. (2005) EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill* 10: 50922- 50921.
- 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 nontransmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* 31:1013- 1024.
- Sperandio, V., Kaper J. B., Bortolini M. R., Neves B. C., Keller R. and Tozzi L. R., Gorietti A.E., Caprioli A. (2001) Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. In: Duffy G, Garvey P, McDowell DA, editors. *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, 161-179.
- Stefan, A., Scaramagli, S., Bergami, R., Mazzini, C., Barbanera, M., Perelle, S. and Fach, P. (2007) Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Can J Microbiol* 53, 337-342.
- Stephan, R. et Untermann, F. (1999) Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers. *J Clin Microbiol* 37: 1570-1572.

- 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* 112: 129-137.
- Strockbine, N. A., Marques L. R., Newland J. W., Smith H. W., Holmes R. K. and O'Brien A. D. (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* 53:135-140.
- Strockbine, N. A., Jackson M. P., Sung L. M., Holmes R. K. and O'Brien A. D. (1988) Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* 170:1116-1122.
- Su, C., and Brandt L. J. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* 123:698-714.
- 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. *Jpn J Infect Dis* 58: 398-400.
- Swerdlow, D.L. et Griffin, P.M. (1997) Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet* 349: 745-746.
- Szalo, I.M, Taminiau, B., Mainil, J. (2006) Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.*, 2006, 150,108-124.
- Taormina, P. J., Beuchat L. R. and Slutsker L. (1999) Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg Infect Dis* 5:626-634.
- Tarr, P. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20:1-8.
- Tesh, V. L., Samuel J. E., Perera L. P., Sharefkin J. B. and O'Brien A. D. (1991) Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* 164:344-352.
- Thomson, J. S., Hodge D. S. and Borczyk A. A. (1990) Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 28:2165-2168.
- Toft, N., Innocent G. T, Mellor D. J. and Reid S. W. (2006) The Gamma-Poisson model as a statistical method to determine if micro-organisms are randomly distributed in a food matrix. *Food Microbiol* 23:90-94.
- Tozzi, A.E., Goriotti, S. et Caprioli, A. (2001) Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. In: Duffy G, Garvey P, McDowell DA, editors. *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, 161-179.

Trabulsi. (1998) Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 164:133-139.

Trevena, W.B., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G. et Wray, C. (1999) Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from animals to humans in Cornwall and west Devon. *Commun Dis Public Health* 2: 263- 268.

Tsujihata, S., Entani, E., Asai, M., Tsukamoto, Y. and Ohta, M. (1998) Mathematical modelling to predict the bacterial effect of processed vinegar on *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 135-138.

Urdahl A.M., Cudjoe K., Wahl E., Heir E., Wasteson Y. (2002) Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103 from sheep using automated immunomagnetic separation (AIMS) and AIMS-ELISA: sheep as the source of a clinical *E. coli* O103 case? *Lett Appl Microbiol.* 35(3):218-22.

Uyttendaele M., Schukkink R., Van Gemen B., Debevere J. (1995) Detection of *Campylobacter jejuni* added to foods by using a combined selective enrichment and nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1341-1347.

Uyttendaele M., Bastiaansen A., Debevere J. (1997) Evaluation of the NASBA nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 13-20.

Uyttendaele, M., Jozwik, E., Tutenel, A., De Zutter, L., Uradzinski, J., Pierard, D., and Debevere, J. (2001) Effect of acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of buffered lactic acid to decontaminate chilled beef tissue and effect of modified atmosphere packaging on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on red meat. *J Food Prot* 64: 1661-1666.

Van de Kar, N.C., Roelofs, H.G., Muytjens, H.L., Tolboom, J.J., Roth, B., Proesmans, W., Reitsma- Bierens, W.C., Wolff, E.D., Karmali, M.A., Chart, H., and Monnens, L.A. (1996) erocytotoxinproducing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe. *Eur J Pediatr* 155: 592-595.

Vernozy-Rozand, C. et Montet, M.P. (2001) *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.

Vernozy-Rozand, C., Bouvet, J., Montet, M.P., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy-Cruchaudet, C., and Richard, Y. (2002) Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin-producing *E.coli* (VTEC) and *E.coli* O157:H7 in France (Poster). In *102th General Meeting of American Society for Microbiology* May, 19-20 Salt-Lake City, USA.

Verstraete K., De Zutter L., Messens W., Herman L., Heyndrickx M., De Reu K. (2010) Effect of the enrichment time and immunomagnetic separation on the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive O157 from artificially inoculated cattle faeces. *Veterinary Microbiology*. Volume 145, Issues 1-2, Pages 106-112.

Vial, P. A., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J. B., Nataro J. P., Maneval D., Elsayed A. and Levine M. M. (1988) Characterization of enteroadherent aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 158:70-79.

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M.L. (2006) Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Letters in applied Microbiologie* 42 102-108.

Vimont A., Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Bavai C., Fremaux B. and Delignette-Muller M.-L. (2007) Growth of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Veterinary Microbiology*, Volume 123, Issues 1-3, Pages 274-281.

Vold, L., Holck A., Wasteson Y. and Nissen H. (2000) High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 56:219-225.

Wadolowski, E. A., Sung L. M., Burriss J. A., Samuel J. E., and O'Brien A. D. (1990) Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* 58:3959-3965.

Watarai, M., Sato T., Kobayashi M., Shimizu T., Yamasaki S., Tobe T., Sasakawa C., and Takeda Y. (1998) Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 66:4100-4107.

Waterman, S. R. & Small, P. (1996) Identification of ss-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 21, 925-940.

Weaver, J.W., Kilpatrick, D.J., McNamara, A.M. (1996) Evaluation of recovery protocols for heat-stressed enterovirulent *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 257-263.

Whittam, T. S., Wolfe M. L., Wachsmuth I. K., Orskov F., Orskov I. and Wilson R. A. (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 61:1619-1629.

Wieler, L. H., McDaniel T. K., Whittam T. S. and Kaper J. B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* 156:49-53.

Willford, J., Mills, K. and Goodridge, L.D. (2009) Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. *J Food Prot* 72, 741-747.

Wilson, J. B., McEwen S. A., Clarke R. C., Leslie K. E., Wilson R. A., Waltner-Toews D. and Gyles C. L. (1992) Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* 108:423-439.

Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L. et Beach, M.J. (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ* 53: 1-22.

Zadik, P. M., Chapman P. A. and Siddons C. A. (1993) Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 39:155-158.

Zhao, T., Doyle M. P. and Besser R. E. (1993) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol* 59:2526-2530.

Zhao, T., Doyle M. P. (1994) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157;H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.* 57: 780-783.