HAL
open science

Mise au point de méthodes de détection des souches d'Escherichia coli productrices de Shiga-toxines (STEC)

Marion Bouvier

To cite this version:

Marion Bouvier. Mise au point de méthodes de détection des souches d'Escherichia coli productrices de Shiga-toxines (STEC). Bactériologie. 2011. hal-01478630

HAL Id: hal-01478630

https://ephe.hal.science/hal-01478630v1

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

par

BOUVIER Marion

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC)

soutenu le 27 juillet 2011 devant le jury suivant :

C. TERZIAN –Président
D. THEVENOT – Tuteur scientifique
L. MATHIEU– Tuteur pédagogique
Y. RICHARD– Rapporteur

Mémoire préparé sous la direction de :
Delphine THEVENOT
Laboratoire de Microbiologie Alimentaire des Pathogènes
1 avenue bourgelat 69280 MARCY L'ETOILE
d.thevenot@vetagro-sup.fr
et de
Laurence MATHIEU
Laboratoire d'Hydroclimatologie médicale Environnement et Santé
15 avenue du Charmois - 54500 Vandoeuvre les Nancy
laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia.coli* productrices de Shiga-toxines (STEC)

BOUVIER Marion

Le 27 juillet 2011

Les *Escherichia coli* producteutrices 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 une 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 mémoire était d'optimiser le protocole de détection des STEC dans les aliments de manière à pouvoir proposer aux industriels des protocoles leur permettant une 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 minimes pour l'analyse d'échantillon de 25g (6h) et la faisabilité d'analyser des échantillons de 375g avec un ratio de dilution de ¼ et un enrichissement de 24h.

Mots-clés : aliments, détection, *E. coli* productrices de Shigatoxine.

Table des matières

Liste des abréviations **1**

Introduction **3**

Mémoire Bibliographique **5**

A. Généralité sur les souches E. coli Productrices de Shiga-Toxines (STEC) 5

1. Taxonomie 5

2. Physiologie des STEC 6

2.1. Facteurs influençant la multiplication des STEC *6*

2.2. La différence entre E. coli O157:H7 et les STEC *8*

3. Etude clinique et pathogénie 9

3.1. Facteurs de virulence *9*

3.2. Pathogénie *13*

3.3. Pathologies humaines associées aux EHEC *13*

4. Epidémiologie 14

4.1. Epidémiologie descriptive *14*

4.2. Epidémiologie *14*

B. Détection des STEC dans les aliments 18

1. Les matrices alimentaires 18

1.1. Les produits laitiers *19*

1.2. La viande de bœuf *19*

2. L'enrichissement des matrices alimentaires 20

2.1. Généralité sur l'enrichissement *20*

2.2. Les différents milieux d'enrichissement utilisés *20*

2.3. La température d'incubation *20*

2.4. La prise d'essai et le volume d'enrichissement *21*

3. Détection des STEC 21

3.1. Tests immunologiques *22*

3.2. Tests génétiques *23*

3.3. L'isolement des STEC après une suspicion *29*

Références bibliographiques **33**

Liste des abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique
AFNOR = Association Française de NORmalisation
AFSSA = Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AOAC = Association of Official Analytical Chemists
A/E = attaching and effacing
ASM = American Society for Microbiology
ARN = acide ribonucléique
BET = Bromure d'Ethidium
BHI = Brain Heart Infusion (bouillon coeur-cervelle)
CDC = Centers for Disease Control and Prevention
CEN = Centre De Normalisation Europen
CNIEL = Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
CT = cycle thresold
CT-SMAC = Céfixime-Tellurite Mac conkey Agar Sorbitol
DAEC = Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse
DLC = date limite de consommation
EAEC = Les *Escherichia coli* entéroagrégatifs
EIEC = Les *Escherichia coli* entéroinvasifs
EHEC = *Escherichia coli* entero-hemorrhagique
ELFA = Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA = Enzyme Linked Fluorescent Assay
EPEC = Les *Escherichia coli* entéropathogènes
EPT = Eau Peptonnée Tamponnée
ETEC = Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes
FDA = Food and Drug Administration
FRET = transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou
transfert d'énergie par resonance de type
FT = Flore Total
GFP = Green Fluorecent Protein
IAFP = International Association for Food Protection
ICE = Immuno-Concentration *E.coli* O157
ICMSF = International Commission on Microbial Specifications for Foods
IMS = Immunomagnetic separation
ISO = Organisation Internationale de Normalisation
LEE = locus d'effacement des entérocytes
LPS = lipopolysaccharide
MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis
PCA = Plate Count Agar
PCR = Réaction de polymerisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PTT = purpura thrombotique thrombocytopénique
RFV = Relative Fluorescence Value

RT-PCR = PCR en temps réel
SDS = Soduim Dodecyl Sulphate
SHU = Syndrome Hémolytique et Urémique
SMAC = Mac conkey Agar Sorbitol
STEC = *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines
TS = Tryptone Sel
TSA = Trypticase soja Agar
TSB = Tryptone Soya Broth
TVC = Total Viable Count
UFC = Unité Formant Colonie
UMAP = Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle
VTEC = verotoxin producing *E. coli*

Introduction

Les *Escherichia coli* font partie de la famille des *Enterobacteriacae*. 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 elles, les *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC) sont considérées comme des pathogènes émergents importants pour la santé publique. Elles peuvent être à l'origine de diarrhées souvent sanglantes. Dans certains cas, des complications peuvent apparaître telles qu'un syndrome hémolytique et urémique(SHU) parfois mortel, notamment chez les enfants en bas âge, ou un purpura thrombotique thrombocytopénique(PTT) 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 (viande hachée, lait et fromages au lait cru, …). Toutefois, l'épidémiologie des infections à STEC a évolué durant ces dix dernières années. 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 bœuf (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*., 2006a). Cette année, une épidémie liée à *E. coli* O26 dans de la viande de bœuf est survenue aux Etats-Unis ainsi qu'une autre liée à *E. coli* O145 ayant contaminé de la laitue.

Dans un avis de l'AFSSA de juillet 2008, et plus récemment, l'avis de janvier 2011 (2010-SA-0031) définit comme souches STEC pathogènes, 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 ci-dessus, 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 sérogroupe 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. D'une part, en fonction des procédures d'échantillonnage mises en œuvre 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 paraissaît 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 détection de ces bactéries dans les aliments.

Avant d'exposer les résultats de notre étude, objet du mémoire expérimental, j'ai replacé 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 détection des STEC 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 O26 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 méthode de référence (IMS : Séparation immuno-magnétique) pour une recherche dans différents échantillons de viande de bœuf (prise d'essai de 25 ou 375 g).

Mémoire Bibliographique

Les journalistes placent régulièrement au devant de la scène des problèmes liés à la sécurité alimentaire. Ainsi, le prion de la maladie de la vache folle, L*istéria monocytogenes* et les salmonelles défrayent souvent la chronique. Il est un pathogène dont on parlait peu pour l'instant en France mais qui est considéré comme gravissime aux Etats-Unis, au Canada, au Japon et dans certains pays de l'Union européenne tel que le Royaume unis et l'Allemagne. Il s'agit des bactéries *Echerichia coli* Productrices de Shiga-Toxines, à l'origine de colites hémorragiques et d'insuffisances rénales parfois mortelles, surtout chez les enfants de moins de cinq ans.

A. Généralité sur les souches E. coli Productrices de Shiga-Toxines (STEC)

1. Taxonomie

Les *Escherichia coli* appartiennent à la famille des *Entrobacteriacae*. Ces bactéries sont des bacilles Gram négatif et oxydase négatif. Au sein de la famille des *Entrobacteriacae*, on trouve de nombreux genres, parmi lesquels *Salmonella*, *Shiegella*, et *Escherichia*. Ce dernier compte cinq espèces dont *coli*. Il est important de confronter la classification phylogénique basée sur les ARN16S à la classification basée sur les caractères biochimiques :

- Les *Escherichia coli* possèdent les caractéristiques biochimiques suivantes : activité uréase, H_2S (sulfure d'hydrogène), citrate négatif, lactose et indole positif.

- Des études phylogénétiques basées sur le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal 16S, ont montré que *E. coli* et Salmonella auraient divergé à partir d'un ancêtre commun il y a 120 à 160 millions d'années. Les *Shigella* auraient émergé des *E. coli* il y a environ 80 millions d'années. Par hybridations ADN-ADN, Brenner *et al*. (1972) ont montré que *Shigella* et *E. coli* partageaient plus de 75 % de similarité, ce qui justifierait l'appartenance des *Shigella* à l'espèce *E. coli*. De plus, la position *des Shigella* et des *E. coli* a été clarifiée par analyse en MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) : Pupo *et al*. (1997) ont montré que les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), entéropathogènes (EPEC) et entérotoxinogènes (ETEC) étaient répartis en plusieurs lignées à l'intérieur des groupes phylogénétiques A et B1. Le groupe B2 était relié aux souches responsables d'infections du tractus urinaire, bactériémies et méningites néonatales mais pas aux souches diarrhéiques. Les EIEC, EPEC, ETEC et les shigelles ont dû évoluer de façon indépendante en différentes lignées et en plusieurs étapes, probablement avec l'acquisition horizontale de facteurs de virulence (Johnson, 2000).

Plus généralement, *E. coli* est considérée comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales à sang chaud. A ce titre *E. coli*, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournissant une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive, notamment les salmonelles. Un grand nombre de ces *E. coli* ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines souches sont connues des médecins comme des agents pathogènes responsables de gastro-entérites infantiles ou de la fameuse "diarrhée du voyageur", souvent d'origine hydrique.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de classification standardisée des souches appartenant à l'espèce d'*E. coli.* Les médecins utilisent une classification comprenant 6 groupes :

Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes (ETEC),
Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC),
Les *Escherichia coli* entéroagrégatifs (EAEC),
Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)
Les *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC).
Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Cependant, cette dernière classification basée uniquement sur les principaux pathotypes intestinaux, est décrite en fonction des signes cliniques engendrés et des facteurs de pathogénicité exprimés. Les microbiologistes préfèrent opter sur une classification basée sur :

- (1) la détermination du <u>sérogroupe</u>. Depuis1947, 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 170 sérogroupes « O » d'*E. coli* sont actuellement connus,
- (2) la détermination, au sein du sérogroupe, du <u>serotype</u>. Le serotype 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 intéressons plus particulièrement aux *E. coli* Producteurs de Shiga Toxine (STEC). 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 risques et notamment la viande hachée de bœuf. Le Japon, quant à lui, incite à la détection du sérotype O157:H7 mais aussi de O26 et de O103 dans les aliments à risque. En France, depuis la recommandation de l'AFSSA d'avril 2006 et (plus récemment le 15 juillet 2008) et dernierement du 10 mai 2010, la situation est plus claire. En effet, une définition des souches STEC hautement pathogènes a été indiquée aux gestionnaires du risque représentés par la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.
Selon cette recommandation, une souche STEC hautement pathogène doit avoir les caractéristiques suivantes :

- elle doit appartenir aux sérogroupes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28;
- elle doit de surcroît posséder concomitamment, deux facteurs de virulence : les gènes *stx* codant pour les *Shiga-toxines,* et le facteur d'attachement et d'effacement *eae.*

2. Physiologie des STEC

2.1. Facteurs influençant la multiplication des STEC

En ce qui concerne les STEC, nous ne disposons actuellement que de très peu d'informations sur les facteurs influençant leur croissance. L'essentiel des renseignements fournis par la bibliographique concerne uniquement le sérotype O157:H7.

2.1.1. La 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 son développement est de 45°C (Doyle et Schoeni, 1984). Cet élément est d'importance, 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 de 40°C (Gonthier *et al.,* 2001 ; Nauta et Dufrenne, 1999), une température minimale de croissance de 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. En revanche, la température optimun de croissance des autres STEC serait de 37°C, notons qu'il existe peu d'études sur ce sujet.
Ainsi, le comportement de croissance des STEC vis-à-vis de la température est analogue à celui des *E. coli* en général. Ces données montrent que la température d'enrichissement de 42°C, telle que 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. Peu d'éléments existent sur l'effet de la congélation sur *E. coli* O157:H7 et plus généralement sur les STEC Toutefois, des études ont été menées pour connaître l'impact de la congélation. Il apparaît cependant que cette bactérie peut survivre à des températures inférieures à -80°C dans des viandes hachées de bœuf. La destruction cellulaire est très limitée lors d'un stockage pendant 9 mois à une température de -20°C (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 et 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*, 1993a). Bien qu'une 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.

2.1.2. Activité de l'eau (a_w)

Nous ne 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 optimun pour sa croissance est de 0.995 selon les données de l'International Comission on Microbial Spécification for Foods (ICMSF 1996).

2.1.3. Tolérance à l'acidité

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 ; tout deux sont plus inhibiteur que l'acide chlorhydrique selon Davies *et al*(1992).
Les fermentations bactériennes qui concernent de nombreux produits alimentaires (saucissons secs, yaourts…) ne peuvent pas garantir l'élimination d'*Ecoli* O157:H7 (Arocha *et al*., 1992).
Plusieurs mécanismes permettent à *E. coli* d'être résistante à l'acidité. Le gène *rpoS* régule les 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 des gènes *rpoS* peuvent être à l'origine de différences d'intensité d'acidotolérance (Waterman et Small, 1996). O'Brien *et al*. (1997) ont montré que des souches d'*Ecoli* des sérogroupes O157 et O111 étaient plus acidotolérantes que des souches appartenant aux sérotypes O91 et O5.

2.1.4. Les 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.
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. Plus de détails seront apportés dans la partie concernant l'enrichissement des STEC.
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 minimes et la bactérie s'adapte bien aux deux situations (Buchanam 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*., 1993a). Par ailleurs, Uyttendaele *et al*.(2001a) ont étudié le comportement d'*E. coli* O157:H7 inoculé à la surface de steaks de bœuf, conservés suivants trois modalités : sous vide, sous atmosphère modifiée (40% CO_2, 60% N_2 ou sous air). Aucun conditionnement testé ne semble influencer la survie d'*E. coli* O157:H7.

2.2. La 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 sérogroupe (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 de la fermentation du sorbitol et de l'activité ß-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 ß-glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne produisent pas de ß-glucuronidase (Tesh *et al.*, 1991). Ces caractéristiques biochimiques particulières sont utilisées pour l'isolement d'*E. coli* O157:H7 (voir paragraphe B2.3).

3. Etude clinique et pathogénie

Les STEC sont responsables de maladies graves mais relativement rares. Les premiers symptomes sont caractérisés par une diarrhée non sanglante. Les symptômes de cette diarrhée peuvent se compliquer en une colite hémorragique et parfois en un syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou en un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte. L'apparition d'un PTT est relativement rare. Notons tout de même qu'en France les STEC sont la première cause d'insuffisance rénal chez le nourrisson ainsi que chez les personnes de moins de 30 ans.

3.1. Facteurs de virulence

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

3.1.1. Les facteurs d'adhésion

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

La colonisation du tube digestif par certaines souches 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).

3.1.1.1 Le système de sécrétion de type III

Les gènes responsables des lésions d'attachement et effacement sont portés par l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE (locus d'effacement des entérocytes), codant un système de sécrétion 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 dans le domaine C-terminal. Cette région est constituée de 2 domaines "Immunoglobulin-like" assurant la reconnaissance du récepteur spécifique Tir présent à la surface de la cellule cible, ainsi que d'un second récepteur non clairement identifié à ce jour. Notons que le gène *eae* est à l'heure actuelle considéré comme le facteur de virulence majeure.

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 au système de sécrétion de type III où il est modifié par des kinases (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 (*esp*A, *esp*B, *esp*D, *espK*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, *esp*F, *esp*G, *esp*H …).

Les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de sécrétion 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).

3.1.2 Les Shiga-toxines

3.1.2.1. Structure des Shiga-toxines

Toutes les souches de STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines (Stx). Ces toxines présentent des homologies avec la toxine de *Shigella* dysenteriae de type 1 (O'Brien *et al*., 1982; Strockbine *et al*., 1988). Ce sont des hétéropolymères de 70 kDa constitués d'une sous-unité A (pour Activité) de 33-kDa et de 5 sous-unités B (pour Binding ou liaison) de 7,7-kDa) La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase sur l'adénosine située en position 2348 de l'ARN ribosomique 28S (Endo *et al*., 1988). 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. Cet opéron est constitué de deux cistrons, l'un proximal codant la sous-unité A, l'autre distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B.

3.1.2.2. Mécanismes de sécrétion des Shiga-toxines

A l'heure actuelle, on ne connaît pas les mécanismes par lesquels les Stx sont sécrétées. Plusieurs hypothèses sont envisagées : les toxines pourraient être sécrétées par la voie classique car les 2 sous-unités A et B possèdent une séquence-signal. Elles pourraient également être relarguées après lyse de la bactérie suite à l'induction des phages. Enfin, les vésicules membranaires pourraient jouer un rôle dans la sécrétion des toxines.

3.1.2.3. Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles

Dans 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). Les récepteurs Gb3 se situent sur les cellules endothéliales. Il est important de souligner que chez les enfants, les récepteurs Gb3 sont plus accessibles et/ou en plus grand nombre que chez les adultes. Une fois la toxine internalisée par un mécanisme classique

d'endocytose, elle 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, et exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S. Puis la partie A1 bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al.*, 1999). Ceci conduit à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort cellulaire. L'effet cytotoxique des Stx peut classiquement être mis en évidence grâce à un modèle *in vitro* sur les cellules de type Vero ou HeLa (Konowalchuk *et al.*, 1977). D'autre part, un effet apoptotique des toxines Stx a été montré sur différents types cellulaires (Jones *et al.*, 2000; Kiyokawa *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1999). Enfin la toxine (et en particulier les sous unités B) pourrait induire la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales (Hurley *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 1999).

3.1.2.4. Différents variants de Shiga-toxines identifiés

Il existe deux grandes classes de Shiga-toxines, les Shiga-toxines 1 (Stx1) et les Shiga-toxines 2 (Stx2). Alors que les toxines Stx1 sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae 1*, les toxines Stx2 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).

Des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales rénales (Louise and Obrig, 1995), et *in vivo* sur des modèles animaux (Lindgren *et al.*, 1993; Wadolkowski *et al.*, 1990b) indiquent que Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Ces résultats sont cohérents avec les données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des cas les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157:H7, produisent Stx2 (Boerlin *et al.*, 1999). Toutefois, de nombreux STEC non-O157:H7 classiquement impliqués dans les cas de SHU, appartenant aux sérogroupes O26:H11, O103:H2, et O111:H-, portent le plus souvent le gène *stx*1.

Au moins cinq variants, ont été différenciés dans la classe des toxines Stx2 : Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, et Stx2f. 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 (Bastian *et al.*, 1998; Bertin *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000; Pierard *et al.*, 1998). Certains variants semblent associés à des hôtes spécifiques : Stx2e est retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine, le variant Stx2d semblant associé aux souches d'origine ovine (Cornick *et al.*, 2000b; Ramachandran *et al.*, 2001). Le variant Stx2e, associé à "l'oedème du porc", est rarement trouvé dans les souches d'origine humaine. Il se lie à un récepteur différent du Gb3 (récepteur humain), le globotétraosyl céramide Gb4 (DeGrandis *et al.*, 1989). D'autre part, le type de variant Stx pourrait influencer directement la virulence des souches (Friedrich *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 1995).

3.1.3. Les facteurs plasmidiques

3.1.3.1. L'entérohémolysine

Un nouveau phénotype hémolytique dû à l'entérohémolysine E-hlyA a été mis en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin *et al*., 1988). La protéine E-hlyA est codée par le gène *ehxA* de l'opéron plasmidique *ehxCABD* (Schmidt *et al*., 1995). Le gène *ehxA* code le précurseur de la protéine de structure E-hlyA. Il présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l'α-hémolysine de *E. coli*. E-hlyC assure l'acylation post-traductionnelle de EhlyA. E-hlyB et E-hlyD sont impliquées dans le transport et la sécrétion de E-hlyA. C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines RTX (Repeats in Toxin). 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). Cependant, l'activité de E-hlyA est moins puissante que celle de l'α-hémolysine : 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). Le rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité des STEC a été suspecté à la suite de la mise en évidence d'anticorps anti-E-hlyA chez des patients (Schmidt *et al*., 1995). Son mécanisme d'action serait lié à la libération de fer engendrée par les hématies lysées, ce qui permettrait un meilleur développement des bactéries. Le gène *ehxA* a été localisé sur les plasmides de haut poids moléculaire de 18 % à 48 % de STEC appartenant à des sérotypes différents, d'origine humaine ou animale (Barrett *et al*., 1992; Pradel *et al*., 2001; Schmidt et Karch, 1996). Cependant, les souches isolées chez le malade ne possèdent pas toujours ce gène, et sa présence n'est pas statistiquement corrélée à la pathogénicité. Le rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité est donc encore discuté.

3.1.3.2. Autres facteurs plasmidiques

Une sérine protéase EspP capable de cliver le facteur V^4 de coagulation humain et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité (Brunder *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 virulence : la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi qu'un système de sécrétion de type II (Brunder *et al*., 1996).

3.1.4. 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 pourraît jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse par le gène *rpoS* (Cheville *et al.*, 1996). Rapellons que la résistance à l'acidité des STEC peut être considerée comme un facteur de virulence.

3.2. Pathogénie

L'essentiel des signes cliniques est lié à la production des toxines Stx. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs de l'hôte (Paton and Paton, 1998b). Après ingestion, les STEC doivent résister à l'acidité de l'estomac. Une étape de colonisation du tube digestif est probablement nécessaire. La plupart des souches STEC (en particulier celles de sérotype O157:H7) sont capables de produire des lésions d'attachement/effacement. Pour les autres, les mécanismes de colonisation sont encore mal connus. Les toxines produites par les bactéries doivent ensuite traverser l'épithélium intestinal, avant de rejoindre le système circulatoire et atteindre les récepteurs spécifiques localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les toxines Stx entraînent la mort des cellules cibles par arrêt des synthèses protéiques. Un rôle des bactéries et/ou des toxines sur l'activation du système immunitaire est également suspecté (Heyderman *et al.*, 2001).

3.3. Pathologies humaines 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 PTT chez l'adulte (Tarr, 1995) (figure 4).

3.3.1. 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 chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile (Griffin et Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). 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 traitements spécifiques 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.

3.3.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Le SHU est une complication de la diarrhée sanglante. Le SHU touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient généralement après une diarrhée prodromique sanglante. Ce n'est qu'en 1983 que Karmali *et al.* (1983) 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. Le SHU post-diarrhée représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et constitue la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Le pronostic rénal est favorable dans environ 2 tiers des cas (Loirat *et al.*, 1992).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Loirat *et al.*, 1992). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement

la principale cause du décès, une enquête française montre que 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996, sont décédés suite à cette complication (Decludt *et al.*, 2000).

Il n'existe pas de traitements spécifiques 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.

3.3.3. Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Le PTT est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz (1925). L'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, autoimmune...) 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 thrombocytopénie (diminution du nombre des plaquettes sanguines), une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë.
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, ce qui dans la plupart des cas est la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale.

4. Epidémiologie

4.1. Epidémiologie descriptive

4.1.1. Populations sensibles

Tous les groupes d'âge sont susceptibles d'être infectés par des STEC. L'âge des patients malades varie de 2 semaines à 96 ans, et l'âge moyen de 6 à 36 ans (Padhye et Doyle, 1991; Roberts *et al.*, 1995 ; Waters *et al*., 1994).
Les populations les plus à risque de développer des infections et des formes sévères, sont les enfants de moins de 3 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans. A titre d'exemple, lors de l'épidémie de 1996 en Ecosse, le risque de développer des complications (SHU/PTT) était 4 fois plus élevé pour ces catégories, qu'entre 15 et 65 ans (Todd et Dundas, 2001).

4.1.2. 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.*, 2002b). 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 Amérique du Nord (Michel *et al.*, 1999).

4.2. Epidémiologie

Les bovins qui sont porteurs sains constituent le principal réservoir des STEC. Ce portage animal est la cause principale de dissémination des STEC dans l'environnement. En plus des bovins porteurs sains, il existe des bovins appelés « super excréteurs ». Il s'agit de bovins qui

disséminent dans la nature de grandes quantités de STEC. La figure 5 résume les différents moyens possibles de contamination à partir des aliments.

Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés. Dans des proportions plus faibles, il existe d'autres modes de contamination comme la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins). Aux Etats-Unis, ces différents modes de transmission, consommation d'aliments contaminés, transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et contact avec des animaux représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % (Griffin *et al.*, 2000).

Plusieurs épidémies liées à STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale insuffisamment cuites. La partie suivante rappelle brièvement les cas d'épidémies dues à des produits carnés, laitiers, des végétaux ou d'autres denrées alimentaires.

4.2.1. Produits carnés

Notons que les produits carnés sont la cause première de contamination de l'homme par les STEC. Plusieurs épidémies d'infection à *E. coli* O157:H7 ont été associées à la consommation de viande de bœuf ou de préparations à base de viande de bœuf, même si on a rarement pu isoler la bactérie à partir de l'aliment incriminé (Chapman *et al.*, 1993b; Cowden, 1997; MacDonald *et al.*, 1988; Rodrigue *et al.*, 1995; Vaillant and Espié, 2002; Willshaw *et al.*, 1993, Griffin and Tauxe, 1991; Tarr *et al.*, 1999).
La viande de petits ruminants (ovins et caprins) n'a que très rarement été suspectée dans des épidémies alimentaires et les études réalisées pour déterminer la prévalence des STEC dans cette viande sont rares.
Les accidents alimentaires dus aux STEC impliquant des aliments à base de viande de porc sont rares (Paton *et al.*, 1996; Tilden *et al.*, 1996).
Des toxi-infections alimentaires dues à *E. coli* O157:H7 et autres STEC mettant en cause de la viande de volailles ou des produits à base d'œufs n'ont jamais été rapportées à ce jour.

4.2.2. Produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis quelques années. En Angleterre, en 1993, *E. coli* O157:H7 est isolé pour la première fois : il s'agissait de lait non pasteurisé (Chapman *et al.*, 1993b). La présence de STEC a aussi été observée dans des laits et des produits laitiers non pasteurisés (Allerberger *et al.*, 2001; Casenave *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993). La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. 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 voie de contamination du lait avant la traite. Concernant la prévalence d'*E. coli* O157:H7 ou d'autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles. Il faut, cependant, souligner la difficulté de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange, due au facteur de dilution.

4.2.3. Les végétaux

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination des personnes par les STEC et en particulier *E. coli* O157:H7. Différents végétaux ont été mis en cause, comme par exemple, la laitue (Ackers *et al.*, 1998; Hilborn *et al.*, 1999), des pousses de luzerne (Breuer *et al.*, 2001; Fratamico and Bagi, 2001; Mohle-Boetani *et al.*, 2001) des pousses de radis blanc (Taormina *et al.*, 1999), et plus récemment des épinards(Wendel *et al.*,2009, Grant *et al*, 2009).

4.2.4. Autres denrées alimentaires

La présence de STEC a aussi été mise en évidence dans du cidre et du jus de pommes non pasteurisés (Besser *et al.*, 1993; Cody *et al.*, 1999; Hilborn *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 1982).

Rares sont les travaux visant à déterminer la prévalence des STEC dans les produits de la pêche. En France, une étude (Dupray *et al*., 1999) a montré que des STEC peuvent être potentiellement retrouvés dans des coquillages en aval d'une zone agricole : 19 % des échantillons de coquillages analysés (7/36) étaient positifs. La zone de production des coquillages analysés était classée B, ce qui implique un passage en bassin de purification avant leur commercialisation. Au Japon, des souches de *E. coli* O157:H7 possédant aussi bien les gènes *stx*1 que *stx*2 ont été isolées (Asai *et al.*, 1999) à partir de saumon après transformation.

La consommation d'aliments à base de viande de bœuf hachée crue et ayant subit des contaminations croissées, notamment lorsque le personnel de cuisine ne se lavait pas les mains après avoir touché la viande, a aussi été décrite (Nataro and Kaper, 1998).

Résumé

Les STEC :

Les STEC (*Escherichia coli* Producing Shiga-toxin) regroupent toutes les souches de *E. coli* possédant les gènes *stx 1* et/ou *2* codant une toxine particulière, appelée Shiga-like toxine. La toxine 2 (Stx2) a été décrite comme plus puissante que la toxine Stx1.

Les bactéries *E.coli* sont définies comme photogènes lorsqu'elles
-appartiennent au sérogroupe O157, O26, O103, O111, O145
-possèdent les facteurs de virulence eae (attachement) et stx (toxines)

Tous les facteurs impliqués dans la pathogénicité de ces souches chez l'homme, ne sont pas encore identifiés.

Les STEC sont qualifiés de pathogènes émergents, néanmoins, tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme.

Les signes cliniques

L'ingestion de STEC peut se traduire par une diarrhée évoluant dans 90 % des cas en diarrhée sanglante, se compliquant, chez 10 % des sujets, d'un SHU. Le SHU, principale cause d'insuffisance rénale du nourrisson, est responsable de séquelles rénales graves dans un tiers des cas. Il peut entraîner la mort dans moins de 5 % des cas.

Epidémiologie

Les personnes les plus succeptibles de développer des complications face aux STEC sont les enfants de moins de 15 ans et les personnes de plus de 65 ans.

Parmi les animaux, les bovins et les ovins sont les réservoirs principaux de ce pathogène mais d'autres animaux d'élevage ou sauvages peuvent également être porteurs de STEC et ainsi participer à la contamination de l'environnement.
Dans le monde, les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies d'infections à STEC sont : la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, les produits laitiers non pasteurisés, les produits végétaux crus ou non pasteurisés (salade, radis blancs, jus de pommes), l'eau de distribution.

B. Détection des STEC dans les aliments

Rappelons que le sérotype, le plus souvent incriminé lors des épidémies est *E. coli* O157:H7. En ce qui concerne la détection de ce serotype, la situation est relativement précise. En effet, la norme ISO EN-16654 spécifie une méthode pour la recherche des *Escherichia coli* appartenant au sérogroupe O157. De fait, il existe un grand nombre de méthodes commercialisées permettant la détection d'*E. coli* O157 validée AFNOR.
En revanche pour la détection des STEC, il n'existe pas de norme décrivant leur détection.

En microbiologie alimentaire, le protocole classique de détection des STEC dans les aliments reproduit toujours le même schéma ; à savoir une première étape d'enrichissement suivie d'une étape de détection qui peut être aussi bien immunologique que génétique. Cette étape permet d'avoir un résultat positif (une suspicion) ou négatif (arrêt des analyses). En cas de suspicion de bactérie cible dans le bouillon d'enrichissement, une étape supplémentaire est nécessaire : il s'agit de la confirmation de la présence de la bactérie mais également de son genre, de son espèce et la caractérisation de ses facteurs de virulence. Cette étape de confirmation consiste à concentrer les bactéries puis les isoler sur une gélose spécifique. Après croissance de ces bactéries sur les milieux gélosés, une caractérisation des colonies est nécessaire. Cette étape de caractérisation peut se faire à l'aide de test au latex, de galerie API (BioMérieux®) ou encore par PCR ou RT-PCR.
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 sur les quartiers avants ou demi carcasses destinés à la fabrication de steaks hachés. Qui plus est, des prélèvements complémentaires peuvent être effectués sur les minerais justes 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.

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 hachée 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*, 2006a) 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 comprit 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 compétition bactérienne 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 bactéries pathogènes 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, un plan de surveillance réalisé 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 existent et peuvent 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'a_w sera comprise entre 0.94 et 0.97 alors que pour les fromages à pâte molle elle sera comprise entre 0.97 et 0.99. La variation de l'ensemble de ces paramètres est susceptible d'influencer la croissance des STEC 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 préparations contenant au moins 50% de viande et complémentée avec des ingrédients d'origine végétale (tomates, oignons...).
Différents types de conditionnement et de conservation 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-vides ou sous-atmosphères modifiées 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'enrichissement des matrices alimentaires

2.1. Généralité sur l'enrichissement

L''enrichissement est une étape importante en microbiologie alimentaire. En effet, la plupart des méthodes de détection utilisées à l'heure actuelle nécessitent une étape d'enrichissement, étant donné les faibles niveaux de contamination retrouvés dans les échantillons environnementaux ou alimentaires (Shinagawa 1997). 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 positifs. L'objectif de l'étape d'enrichissement est de permettre la croissance des STEC au delà du seuil permettant leur détection, tout en défavorisant au maximum le développement de la microflore annexe. L'étape d'enrichissement consiste à prélever une quantité donnée d'aliment, on parle alors de prise d'essai. A cette prise d'essai est ajouté un bouillon d'enrichissement. Ce mélange est ensuite incubé à la température optimum de croissance des bactéries cibles pendant une certaine durée. La température et le temps d'incubation varient en fonction de la bactérie recherchée.

2.2. Les différents milieux d'enrichissement utilisés

A l'heure actuelle trois milieux d'enrichissement sont plus largement utilisés pour la recherche des STEC : le Trypticase Soya Broth modified (mTSB) (39,3%), le milieu *E. coli* (25,3%) et l'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) (15,6%) (Vimont 2006).
L'étape d'enrichissement de la matrice alimentaire est une étape très complexe. En effet, lors de cette d'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 recherché ou à l'inverse en limitant la croissance des bactéries non recherchées. En effet, il a été montré que, dans 60% des cas, un antibiotique était ajouté au milieu d'enrichissement. La novobiocine était l'antibiotique le plus fréquemment utilisé (Vimont 2006). D'autres antibiotiques peuvent être ajoutés comme la vancomycine. D'autres composants peuvent être utilisés comme l'acriflavine, il s'agit d'un colorant qui s'intercale à l'intérieur des acides nucléiques inhibant ainsi la réplication virale et bactérienne. Cet intercalant est essentiellement rajouté dans les enrichissements de produits laitiers car l'acriflavine inhibe le développement des bactéries lactiques au profit des STEC.

2.3. La température d'incubation

Pour *E. coli* O157:H7, il a été démontré qu'un enrichissement à 41.5 °C favorisait son développement alors qu'une telle température ralentissait la croissance des autres bactéries présentes dans la matrice alimentaire. En revanche pour les autres STEC, la situation est plus confuse : peu d'étude ont été menées. Rappelons qu'il n'existe pas de référentiel pour la

recherche des STEC. Actuellement, la majeure partie des enrichissements des STEC non O157 ont lieu à 37°C. A titre d'information, un projet de spécification technique européen pour la recherche des STEC dans les matrices alimentaires, préconise un enrichissement à 37°C pour STEC (c'est à cette température qu'on a le plus de chances de retrouver les cinq STEC concomitament).

2.4. La prise d'essai et le volume d'enrichissement

Lors de l'étape d'enrichissement, la prise d'essai ainsi que le volume d'enrichissement utilisé peuvent varier. La prise d'essai la plus couramment utilisée est la même que celle préconisée par la norme ISO EN-16654 : 25g de matrice alimentaire dans 225ml d'EPT c'est-à-dire une dilution au 1/10. Une pratique récente venant des Etats-Unis consiste à étudier une prise d'essai plus importante : on parle de « pooling » d'échantillons. Cette technique permet d'augmenter la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans les produits grâce à une prise d'essai plus importante par lot. La masse de l'échantillon « pooler » peut s'échelonner de 75 à 750g.

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 steak haché ou de minerais peut toutefois engendrer l'obtention de faux négatifs. En effet, le « pooling » d'échantillons entraine une dilution de la quantité de bactéries cibles recherchées mais aussi une augmentation de la flore annexe. Lors de la réalisation de « pooling » d'échantillons, le volume de milieu ajouté aux différentes prises d'essai varie. Certaines fois, la dilution au 1/10 de l'échantillon est respectée (75g:675ml ; 125g:1125ml ; 375g:3375ml). Cependant, une dilution au quart peu aussi être appliqué. Guerini *et al*., 2006 ont aussi montré 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.

Pour conclure, rappelons que cette étape particulièrement délicate consiste à trouver un équilibre entre l'inhibition de la croissance de la flore annexe et un développement 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 cette étape afin de gagner du temps, mais actuellement ceci n'est pas réalisable.

3. Détection des STEC

Les méthodes traditionnelles standardisées de détection des bactéries pathogènes (et d'altération) reposent sur des protocoles compliqués. Ces méthodes présentent l'avantage d'avoir des taux de détection très bas et de pouvoir être utilisées sur des matrices complexes. Cependant leurs applications sont longues et fastidieuses. Des protocoles plus rapides remplaçant les étapes d'isolement et parfois d'indentification de la bactérie sur gélose ont 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 ARN (PCR, RT-PCR…). Actuellement, il existe un grand nombre de méthodes validés par différentes autorités pour la recherche d'*E. coli* O157:H7. Au cours de ce rapport, les méthodes validées AFNOR seront plus particulièrement étudiées.

3.1. Tests immunologiques

A l'heure actuelle, il existe deux grandes familles de tests immunlogiques. Ils sont soit basés sur des systèmes immuno-chromatiques ou sur des systèmes dits ELISA ou ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Ces tests ont lieu après une phase d'enrichissement (le plus souvent d'une durée de 24 heures).

3.1.1. Les Systèmes immuno-chromatographiques

Ces méthodes immunologiques donnent un résultat en 15 minutes. Ces tests sont communément appelés « test en une étape ». 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 puits 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) 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.
Il existe aussi des tests suivants le même principe permettant la détection des Shiga-Toxine 1 et 2, comme le test EHEC commercialisé par la société Meridian. Il permet d'obtenir en 20 minutes une réponse. Ce test est essentiellement utilisé pour la recherche des Shiga-Toxines dans les bouillons de culture de selles A l'heure actuelle, il n'existe aucun kit basé sur des Systèmes immuno-chromatographiques validé AFNOR.

3.1.2 Les systèmes ELISA/ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)

Ces méthodes immunologiques génerent 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 RIDASCRREN®Verotoxin.

Basé sur le même principe la société BioMérieux® a mis au point des kits ELISA ou ELFA automatisées. Les Kit VIDAS® sont des tests automatisée sur le système VIDAS®.

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. 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-Méthylombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthylombelliferone) 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).

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.

A titre d'information, le Kit VIDAS ECO et VIDAS UP sont tous deux validés AFNOR

3.2. Tests génétiques

Les tests génétiques sont composés d'une étape supplémentaire par rapport aux tests immunologiques. En effet, ces tests 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.

3.2.1. 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 quelle soit physique ou chimique.
Une des techniques de lyse bactérienne est la sonification. Elle consiste à détruire la paroi cellulaire par émission d'ultrasons, afin de permettre l'extraction des acides nucléiques. Le choc thermique est une autre technique de lyse cellulaire, qui détruit les parois sous l'action de la chaleur. Certaines méthodes de lyse utilisent des détergents tels que le SDS (Soduim Dodecyl Sulphate) ou encore le triton X-100.

Notons toutefois qu'une préparation des échantillons qui utilise uniquement une méthode de lyse peut-être insuffisante voir inefficace. En conséquence, une extraction grâce à des kits d'extraction manuel est possible, le principe de ces kits est le suivant : la première étape consiste à lyser les bactéries. En parallèle, une inactivation des RNase a lieu. Ensuite l'ADN est absorbé sur une membrane de silice contenu 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 actuellement deux principaux automates : l'automate EZ1 commercialiser par la société Giagen ou encore l'automate EASYMAG commercialisé par la société BioMérieux.
Toutes ces étapes permettent d'améliorer la détection des 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 ou de la méthode de préparation des échantillons avant analyses.
De manière générale, les faux résultats négatifs qui résultent de l'action des inhibiteurs, peuvent apparaître pour diverse raisons :

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

3.2.2. Amplification d'ADN et d'ARN

Dans un souci de clarté, ce paragraphe sera articulé de la manière suivante. La première partie expliquera le principe général d'amplification d'ADN grâce à une méthode appelé 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'automate capable de réaliser une PCR. Dans cette partie, une précision sera apportée sur les kits validés pour la recherche d'*E. coli* O157.

3.2.2.1 Le principe de la PCR

La « Polymérase Chain Reaction » ou PCR est une technique de réplication 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.
Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brins d'ADN dans un

thermocycler. Un thermocycler est un automate capable de réaliser des montées et descente en température de manière très précise.

La première étape d'une PCR consiste en une étape de chauffage. Cette étape permet tout d'abord de casser les structures secondaires de l'ADN, mais aussi d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique. Enfin, cette étape de chauffage entraine la dénaturation des enzymes naturellement présentes dans les échantillons.

Après cette, l'amplification d'ADN a lieu grâce à une succession de cycles comprenant trois étapes :

-1- La phase de dénaturation

Lors de cette étape très courte (environ une minute), une déshybridation d'une séquence cible d'ADN double brin est réalisé entrainant la formation de deux ADN simple brin.

-2- La phase d'hybridation des amorces

Cette étape permet aux amorces ou « primer » en anglais de se « fixer » des deux côtés du fragment d'ADN simple brin spécifique à amplifier. La température de cette étape est fixée en fonction de la température de fusion (Tm) des amorces.

-3- La phase d'élongation

Lors de cette étape, la synthèse de la séquence d'ADN cible a lieu grâce à une enzyme, la Taq-polymérase. A la fin de ce premier cycle de l'ADN double brin est obtenu et un nouveau cycle peut alors recommencer

A la fin de la PCR, des amplicons (produit de la PCR) sont obtenus, l'étape suivante consiste à les révéler.

3.2.2.2 La révélation des produits de PCR

Il existe plusieurs techniques pour réaliser cette étape. En effet, la mise en évidence des produits de PCR peut avoir lieu après l'étape d'amplification, il s'agit alors de la PCR dite conventionnelle. 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 (Real Time PCR).

Révélation lors de la PCR conventionnelle :

La plus ancienne technique de révélation est basée sur la migration des amplicons dans un gel d'agarose. Ce gel est placé dans une cuve d'électrophorèse. Chaque produit de PCR est déposé dans les puits du gel d'agarose. Un courant électrique est appliqué entrainant la migration des amplicons à travers le gel d'agarose du courant électrique « + » au « - ». Rappellon que l'ADN est chargé négativement. Après migration, une lecture du gel sous Ultra Violet (UV) est effectuée. En effet, lors de la réalisation du gel, du BET (bromure d'Ethidium) a été ajoutée. Ce produit possède la propriété d'être fluorescent sous UV. Le BET est un agent mutagène s'intercalant dans les bases de l'ADN. Ce produit étant mutagène, des solutions alternatives au BET ont été découvertes comme le Gel-red® commercialisé par la société Invitrogene®. Ce nouveau produit rempli les même fonctions que le BET avec un deux avantages majeurs : il est sans danger pour le manipulateur et peut être éliminé avec les déchets microbiologique (incinération) du laboratoire.

Révélation lors de la RT-PCR :

Il existe plusieurs techniques pour révéler les amplicons lors d'une RT-PCR. Dans les paragraphes suivants quatre techniques différentes seront être évoquées, à savoir l'utilisation du SYBER-Green, de sondes hydrolyse, de sondes d'hybridation et de molécule Beacons.

- Le SYBER-Green

Le SYBER-Green est un agent intercalant très stable qui s'insère dans la chaine d'ADN uniquement s'il se trouve sous la forme double brin. En solution, lorsque qu'il se trouve sous la forme libre, le SYBER-Green n'est pas fluorescent, alors qu'il est fluorescent quand il est lié à l'ADN.

-les sondes hydrolyses (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 intercalant), et sont composées d'un quencher (extincteur) qui émet de la fluorescence et d'un reporter (émetteur) qui l'absorbe. Lorsque la sonde est intacte (reporteur et quencher à coté), le quencher absorbe la fluorescence émisse par le reporter. 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 reporteur est alors éloigné 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. 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 (extrimité 3').

Contrairement aux agents intercalant, 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 d'hybridation (Hybprobes)

Les Hybprobes sondes sont basées sur la technologie FRET. Les sondes sont séparées et n'émettent pas de fluorescence. Lors de l'étape d'hybridation, les sondes se « fixent » sur leurs séquences cibles. La proximité des fluorochromes permet le transfert d'énergie de l'un à l'autre avec émission de fluorescence. Une mesure de fluorescence a alors lieu avant l'étape d'élongation. Lors de cette dernière, la taq-polymérase « déplace » les sondes qui se trouvent à nouveau libre dans le milieu réactionnel.

-les molécules Beacon

Une molécule Beacon est un oligonucléotide d'ADN ayant la forme d'une épingle à cheveux. Elle est constituée de deux parties : une partie en boucle correspond à la séquence complémentaire de la séquence d'ADN cible et une partie linéaire constituée de deux séquences complémentaires permettant de refermer la boucle sur elle-même. Aux extrémités linéaires se trouvent un quencher et un reporter. En présence d'une séquence cible, il y a hybridation de la molécule entrainant son ouverture. Le quencher et le reporter sont séparés et il y a émission de fluorescence. Ces molécules sont à l'heure actuelle peu utilisées a cause de leur coût élevé.

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 conventionnelle 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.

3.2.2.3 Les automates capable de réaliser une RT-PCR

Il existe deux types d'automates sur le marché, les premiers, sont 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 ». On trouve ce type d'automates essentiellement dans les laboratoires de recherche. Ces automates contiennent des logiciels qui permettent de créer des programmes de PCR spécifiques et d'employer leurs propres amorces. L'interprétation des résultats est réalisée par le manipulateur. Ce type d'automate nécessite une bonne connaissance en biologie moléculaire et sont inadaptés aux analyses en routine. On peut citer comme exemple l'automate Ligtcycler de roche ou encore l'automate Stepone d'applied biosystems (voir parties suivantes).

3.2.2.4 Les kits immunologiques validés AFNOR

A l'heure actuelle, il existe un grand nombre d'industriels commercialisant des automates et des kits de détection permettant la recherche de *E .coli* O157:H7. Seul quatre kits sont validés AFNOR. Il s'agit de l'automate BAX (Oxoid), Genesystems, IqCheck(Biorad) et plus récemment le test HQS_*E. Coli* O157:H7 (ADNucleis). Le principe et le fonctionnement des ces appareil sont détaillés dans les paragraphes suivants :

L'automate BAX

BAX est un automate de détection microbienne pour les recherches des pathogènes et des flores d'altération 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 fluochrome, 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 final. 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 différentes comme les *E .coli* O157:H7 et les salmonelles. Ce temps comprend 2h30 de cycle de PCR et 1h de détection.

L'automate Genesystems

L'automate Genesystems appelé « GeneDisk Cycler » est un outil de diagnostic des légionelles, des *Listéria*, 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 pré-chargées 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 14). Ce disque est appelé un « GeneDisc ».
Un « GeneDisc » permet d'analyser 6 échantillons à la fois. A titre d'exemple pour la recherche des STEC, la société Genesystems a mis au point deux types de « GeneDisc » différents. Le premier permet la détection simultanément des gènes ciblant les serotypes d'*E. coli* O26, d'*E. coli* O103, d'*E. coli* O111, d'*E. coli* O145 et du gène ciblant FliC H7. Le deuxième quant à lui, permet la détection des gènes ciblant le sérotype de *E. coli* O157 et les 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 ».

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).

Ces automates permettent la réalisation d'une PCR. Lors de l'amplification une sonde de type Beacon (sonde breveté) 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 présomptive de *E .coli* O157:H7 dans la prise d'essai analysée. Un ADN synthétique « contrôle interne » est amplifié an 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 (réactif et bille de lyse, sondes fluorescentes, solution d'amplification, contrôle négatif et positif).
Il est important de noter que l'ensemble de ces kits de détection ne sont validés 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

Le test HQS *E. coli* O157:H7 repose sur la technique PCR basée sur l'utilisation du SYBERgreen (Figure 16). 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 :

Appied Biosystems : ABI 70000 / 7300 / 7500 / 7900
Quiagen : Rotorgene

Eppendorf : Realplex
Stratagene : MX3005P

3.3. L'isolement des STEC après une suspicion

L'ensemble des tests cités précédemment permettent seulement de donner un résultat présomptif sur 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 de confirmation passe entre autre par l'isolement et l'identification de la bactérie cible recherchée (sérogroupe, flagelles, présence des facteurs de virulence…). Pour cela, il existe la technique IMS pour Immuno Séparation Magnétique. Cette technique permet de rechercher (et d'isoler) les *E. coli* appartenant aux 5 sérogroupes reconnus pathogènes par l'AFSSA. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'autres techniques permettant l'isolement des STEC non-O157.
En revanche, pour l'isolement d'*E. coli* O157, il existe deux méthodes validées par les autorités : l'IMS et le Kit *Immuno-Concentration E. coli* O157 (ICE) commercialisé par la société BioMérieux. Le principe de ces deux méthodes validées est détaillé dans les paragraphes suivants.

3.3.1 Les méthodes permettant l'isolement des STEC

3.3.1.1 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 de particules magnétiques qui sont isolées de l'échantillon par application d'un aimant. En diluant les cellules cibles ainsi isolées dans un volume inférieur à celui duquel elles proviennent, un effet de concentration des cellules bactériennes est obtenu. Ainsi la sensibilité des systèmes de détection est augmentée. Les billes sont mises en culture sur des milieux sélectifs. Les colonies caractéristiques sont ensuite confirmées à l'aide de tests biochimiques (galeries API, BioMérieux®) et immunologiques (test d'agglutination latex O157, recherche des Shiga-toxines par ELISA).
Il existe des particules paramagnétiques pour les 5 serogroupes considérés comme pathogènes par l'AFSSA (annexe 2 : protocole de l'IMS).

3.3.1.2 le test VIDAS 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 placé 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 puits 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.

3.3.2 Les différents milieux d'isolement des STEC

3.3.2.1 Isolement des *E. coli* O157:H7

Des milieux sélectifs et spécifiques du sérotype O157:H7 sont aussi disponibles comme le milieu MacCONKEY Sorbitol (CT-SMAC) . Sur ce milieu, la microflore secondaire est inhibée par l'association entre les sels biliaires, 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 présentées un halo orangé d'alcalinisation. A titre d'information, ce milieu est utilisé dans la norme ISO 16654.

Un deuxième milieu spécifique d'*E. coli* O157:H7 existe : le milieu ChromID O157:H7(BioMérieux). Cette gélose contient un mélange d'hydrates de carbone et deux substrats chromogènes pour la détection de deux activités enzymatiques :
la ß-D-galactosidase présente chez toutes les souches d'*E. coli* quel que soit leur sérotype et la. ß-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 chromID™ 0157: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.

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 . 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.

3.3.2.2 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 les caractéristiques biochimiques communes rendant possibles l'utilisation d'un milieu d'isolement particulier.
Toutefois, il existe des milieux spécifiques à une espèce comme le milieu Coli ID (BioMérieux). Ce milieu est un chromogène 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-galatosidase; les colonies d'*E. coli* apparaissent roses grâce à la mise en évidence de la β-glucuronidase. Les géloses sont incubées 18/24 heures à 37°C. Ce milieu est utilisé dans la norme ISO 16654.

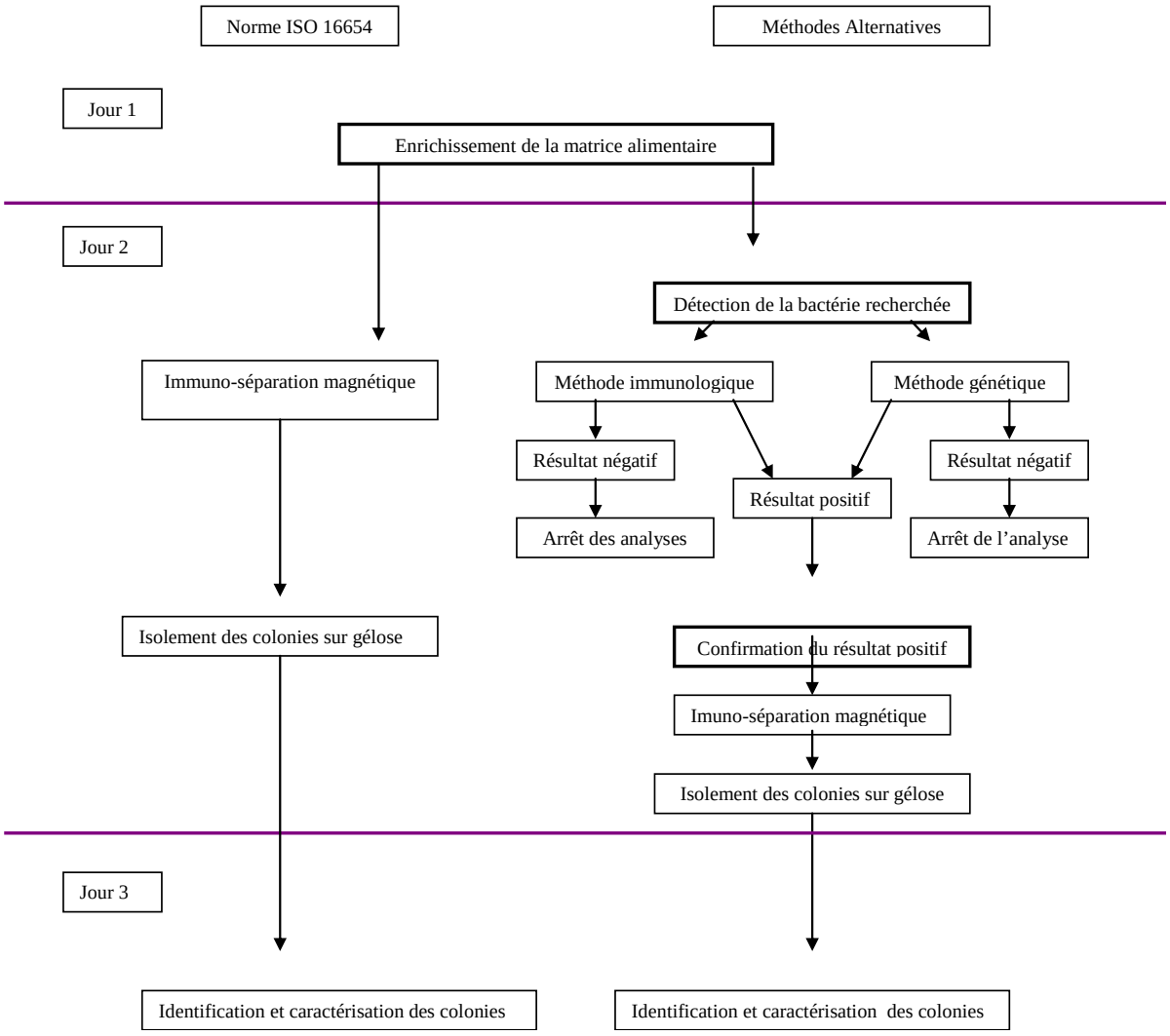
Les STEC non-O157 ne sont pas repérées sur SMAC. Ce milieu est donc inadapté. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose "entérohémolysine". La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de moutons lavés, additionnés d'ions Ca2+ (Beutin *et al*., 1989) Il y a des limites à cette méthode. En effet, les colonies présentant une hémolyse caractéristique doivent toutes être confirmées STEC (mise en évidence du gène codant les vérotoxines) (Beutin *et al*., 1996). D'autre part, une proportion de STEC non-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 de l'enzyme 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 patients malades. Il s'agit donc de souches ayant résistées à de nombreux paramètres comme le passage dans l'estomac des patients, rendant certainement ces souches plus résistantes. On peut émettre l'hypothèse que des souches stressées peuvent avoir des difficultés à se développer sur un tel milieu entrainant l'apparition de faux résultats négatifs. De la même façon, l'utilisation d'antibiotiques peut entrainer l'apparition de faux résultats négatifs.

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 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*.

Résumé

Le schéma ci-dessus récapitule les différentes étapes nécessaires pour la détection des STEC et plus particulièrement des *E.coli* O157:H7. A gauche sont représentées les étapes à effectuer selon la norme ISO 16654, et à droite les étapes réalisées lors des méthodes alternatives.



En conclusion, la détection des STEC nécessite plusieurs jours. Un minimum de trois jours pour la méthode ISO 16654. En revanche, en cas de résultats négatif, les méthodes alternatives présentent donc l'avantage d'obtenir un résultat en deux jours autorisant un gain de temps non négligable.
Les nombreuses étapes permettant la détection des STEC, sont à chaque fois des étapes comportant de nombreux paramètres à prendre en compte. Il en résulte que la détection des STEC est un processus relativement complexe.

Références bibliographiques

Livre :

Montet Marie-Pierre, Vernozy-Rozand Christine, 2005, *Escherichia coli* O157:H7, LAVOISSIER, 164 pages

Verrnozy-Rozand, C., Roze, C. (2003) Bilan de connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC).

Articles :

Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., and Ammar, M.S. (1993a) Survival and growth of Escherichia coli O157:H7 on salad vegetables. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1999-2006.

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., and Birkhead, G. (1997) Swimmingassociated haemorrhagic colitis due to Escherichia coli O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect* **119**: 1-8.

Akashi, S., Joh, K., Tsuji, A., Ito, H., Hoshi, H., Hayakawa, T., Ihara, J., Abe, T., Hatori, M., Mori, T. (1994) A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with Escherichia coli O157:H7 in Japan. *Eur J Pediatr* **153**: 650-655.

Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A., and Cheasty, T. (1999) Outbreak of Escherichia coli O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch Dis Child* **81**: 60-63.

Allaby, M.A., and Mayon-White, R. (1995) *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun Dis Rep CDR Rev* **5**: R4-6.

Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W., and Karch, H. (2001) Escherichia coli O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill* **6**: 147- 151.

Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L., and Obrig, T.G. (2002) Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* **17**: 293-298.

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.

Arocha MM., Mcvey M., Loder SD., Rupnow JH., Bullerman L. (1992). Behaviour of haemorrhagic Escherchia coli O157: H7 during the manufacture of cottage cheese. *J Food Protect*, **55** : 379-381

Asai, Y., Murase, T., Osawa, R., Okitsu, T., Suzuki, R., Sata, S., Yamai, S., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., and Watanabe, H. (1999) [Isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 from processed salmon roe associated with the outbreaks in Japan, 1998, and a molecular typing of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis]. *Kansenshogaku Zasshi* **73**: 20-24.

Barrett, T.J., Kaper, J.B., Jerse, A.E., and Wachsmuth, I.K. (1992) Virulence factors in Shiga-like toxin-producing Escherichia coli isolated from humans and cattle. *J Infect Dis* **165**: 979-980.

Bastian, S.N., Carle, I., and Grimont, F. (1998) Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing Escherichia coli. *Res Microbiol* **149**: 457-472.

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.

Baylis C.L. (2009) Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli.international journal of dairy technology***. 62** 293-307

Belongia, E.A., Osterholm, M.T., Soler, J.T., Ammend, D.A., Braun, J.E., and MacDonald, K.L. (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *Jama* **269**: 883-888.

Beltrametti, F., Kresse, A.U., and Guzman, C.A. (1999) Transcriptional regulation of the esp genes of enterohemorrhagic Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**: 3409-3418.

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 freshpressed apple cider. *JAMA* **269**: 2217-2220.

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., and 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.

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

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.

Boerlin, P. 1999. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **56**: 735-741.

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 Verocytoxin-producing Escherichia coli (VTEC). *Communicable Disease and Public Health* **3**: 14- 23.

Booth, L., and Rowe, B. (1993) Possible occupational acquisition of *Escherichia coli* O157 infection. *Lancet* **342**: 1298-1299.

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., and Piussan, C. (1997) Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **11**: 36-39.

Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L., and Griffin, P.M. (2001) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* **7**: 977-982.

Brewster, D.H., Brown, M.I., Robertson, D., Houghton, G.L., Bimson, J., and Sharp, J.C. (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* **112**: 441-447.

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** (Pt 11): 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 Klawitter, L.A. (1992) The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on thr growth kinetics of E. coli O157:H7. *Food Microbiology* **9**: 185-196.

Burnens, A.P., Zbinden, R., Kaempf, L., Heinzer, I., and Nicolet, J. (1993) A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Zentralbl Bakteriol* **279**: 512-517.

Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. et Griffin, P.M. 1996. Proposed New nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62**: 118-119.

Carter, A.O., Borczyk, A.A., Carlson, J.A., Harvey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A., Krishnan, C., Korn, D.A., and Lior, H. (1987) A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7--associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* **317**: 1496-1500.

Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoit, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P., and Grimont, P. (1993) Eclosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bull Epidemiol Hebdomadaire* **1993**: 222-224.

Catarame, T.M.G., O'Hanlon, K.A., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S., Mc Dowell, 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.

CDC (1996) Lake-associated outbreak of Escherichia coli O157:H7--Illinois, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **45**: 437-439.

CDSC (2000b) Outbreak of VTEC O157 in South Yorkshire. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **10:** 359.

Chapman, P.A., Wright, D.J., and Higgins, R. (1993b) Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. *Vet Rec* **133**: 171-172.

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.

Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., and Vugia, D.J. (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.

Cornick, N.A., Matise, I., Samuel, J.E., Bosworth, B.T., and Moon, H.W. (2000b) Shiga toxin-producing Escherichia coli infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J Infect Dis* **181**: 242-251.

Cowden, J.M. (1997) Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157 November-December 1996. *Eurosurveillance* **2**: 1-2.

Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., Nauta, J., and Wolff, E.D. (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water. *Clin Nephrol* **46**: 45-49.

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., and 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 vérotoxigenic *E.coli* Leatherhead Food Research Assocition., *Reasearch Report,* N 691

Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B. et Loirat, C. 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect* **124**: 215-220.

DeGrandis, S., Law, H., Brunton, J., Gyles, C., and Lingwood, C.A. (1989) Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* **264**: 12520-12525.

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.

Dev, V.J., Main, M., and Gould, I. (1991) Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157. *Lancet* **337**: 1412.

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.

Doyle MP., Schoeni, JL. (1984) Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol.* **48(4**):855-866.
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.

Dupray, I., Caprais, M.P., Derrien, A., Monfort, P., Convenant, A., Penot, J., Fach, P.D., F., Pérelle, S., Grout, J., Federighi, M., Jugiau, F., and Rama, F. (1999) Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de Fresnaye. In *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*. IFREMER (ed.) Ploufragan, Saint Brieuc - France, pp. 169-178.

Dusserre E., Ginerva ., Hallier-Soulier S., Vandenesch F., Festoc G., Etienne J., Jarraud S., Molmeret M. (2008) A PCR-Based Method for Monitoring Legionella pneumophila in Water Samples Detects Viable but

Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. *Applied and environmental microbiology*, **74(15)** pp. 4817-4824

Elliott, E.J., Robins-Browne, R.M., O'Loughlin, E.V., Bennett-Wood, V., Bourke, J., Henning, P., Hogg, G.G., Knight, J., Powell, H., and Redmond, D. (2001) Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome : clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* **85**: 125-131.

Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA Nglycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**: 45-50.

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.

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.

Fratamico, P.M., and Bagi, L.K. (2001) Comparison of an immunochromatographic method and the TaqMan E. coli O157:H7 assay for detection of Escherichia coli O157:H7 in alfalfa sprout spent irrigation water and in sprouts after blanching. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**: 129-134.

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.

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.

Fremaux b.,(2006) Écologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les effluents d'élevages bovins et le sol, these de doctorat d'université claude bernard – lyon 1**,** 320 p

Friedman, M.S., Roels, T., Koehler, J.E., Feldman, L., Bibb, W.F., and Blake, P. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin Infect Dis* **29**: 298-303.

Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., and Karch, H. (2002) Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**: 74-84.

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.

Glass, K.A., Loefelholz, J.M., Ford, P., and Doyle, M.P. (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-Faublee, 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.

Griffin, P.M. et Tauxe, R.V. 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., Mead, P., Van Gilder, T., Hunter, S., Strockbine, N., and Tauxe, R. (2000) Shiga Toxinproducing 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.

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.

Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., and Grimont, F. (2002b) 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.

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.

Hepburn, N.F., Mac Rae, M., Johnston, M., Mooney, J., Ogden, I.D. (2002) Optimising enrichment conditions for the isolation of E. coli O157 in soils by immunomagnetic separation. *Lett. Appl. Microbiol*. **34**, 365-369.

Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Beumer, R.R., and de Boer, E. (1999a) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* **62**: 1115-1122.

Heuvelink, A.E. (2000) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in humans and the food chain. Thèse de science - Université catholique de Nijmegen.

Heuvelink, A.E., van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J.T., van Oosterom, R., Edink, K., van Duynhoven, Y.T., and de Boer, E. (2002) Escherichia coli O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect* **129**: 295-302.

Heyderman, R.S., Soriani, M., and Hirst, T.R. (2001) Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol* **9**: 262-266.

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.

Hilborn, E.D., Mshar, P.A., Fiorentino, T.R., Dembek, Z.F., Barrett, T.J., Howard, R.T., and Cartter, M.L. (2000) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect* **124**: 31-36.

Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E., and Kangesu, E. (1996) An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev* **6**: R33-36.

Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., 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**(3), 922-925.

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.

Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. et 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 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., and 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.

Jerse, A.E., Gicquelais, K.G., and Kaper, J.B. (1991) Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing Escherichia coli. *Infect Immun* **59**: 3869-3875.

Jones, N.L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M.A., Perdue, M.H., Zanke, B.W., and Sherman, P.M. (2000) Escherichia coli Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**: G811-819.

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.,* **71**, Issue 10: 2065-2070.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. et Lim, C. 1983. Sporadic cases of haemolyticuraemic 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., and 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.

Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., and 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.

Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T., and Doyle, M.P. (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Jama* **277**: 1229-1231.

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.

Kiyokawa, N., Taguchi, T., Mori, T., Uchida, H., Sato, N., Takeda, T., and Fujimoto, J. (1998) Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by Escherichia coli Shiga toxins 1 and 2. *J infect Dis* **178**: 178-184.

Kohli, H.S., Chaudhuri, A.K., Todd, W.T., Mitchell, A.A., and Liddell, K.G. (1994) A severe outbreak of *E. coli* O157 in two psychogeriatric wards. *J Public Health Med* **16**: 11-15.

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. et Drouin, J. 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**: 177-179.

Lea, N., Lord, J.M. et 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.

Levine, M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* **155**:377-389.

Licence, K., Oates, K.R., Synge, B.A., and Reid, T.M. (2001) An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect* **126**: 135-138.

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. et 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

Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. et 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. et Elion, J. 1992. Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques, In: Flammarion-Médecine-Sciences (Ed.) *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker.Paris,* . 133-158.

Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K., Rahn, K., Borczyk, A., and Lior, H. (1999) Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect* **123**: 17-24.

Louise, C.B. et Obrig, T.G. 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shiga-like toxin II with human renal endotheial cells. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.

Ludwig, K., Ruder, H., Bitzan, M., Zimmermann, S., and Karch, H. (1997) Outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in a large family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**: 238-241.

MacDonald, K.L., O'Leary, M.J., Cohen, M.L., Norris, P., Wells, J.G., Noll, E., Kobayashi, J.M., and Blake, P.A. (1988) *Escherichia coli* O157:H7, an emerging gastrointestinal pathogen. Results of a oneyear, prospective, population-based study. *Jama* **259**: 3567-3570.

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.

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*.

Matthews, K.R., Murdough, P.A., and 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., W. A. McMahon, A. Schultz, V. Aleo, R. Huffman, M. Curiale, and R. C. Silliker. 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.*

Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli :* identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296- 306.

Melton-Celsa, A.R., Darnell, S.C., and O'Brien, A.D. (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **64**: 1569-1576.

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.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., and Yanagawa, H. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* **150**: 787-796.

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., Moulsdale, M., Cheasty, T., and 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.

Mohle-Boetani, J.C., Farrar, J.A., Werner, S.B., Minassian, D., Bryant, R., Abbott, S., Slutsker, L., and Vugia, D.J. (2001) *Escherichia coli* O157 and Salmonella infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann Intern Med* **135**: 239-247.

Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., and Caprioli, A. (1998) Enteroaggregative, 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.

Murphy M., Carroll A., Walsh C., Whyte P., O'Mahony M., Anderson W., McNamara E., Fanning S. (2007) Development and assessment of a rapid methd to detect Escherichia coli O26, O111 and O157 in retail minced beef. *Int. J. of Hygiene. and Env. Health..* **210**.Issue: 2: 155-161.

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., Deacon, J., and Bell, C. (1994) A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dai 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..***41**(7), 2884-2893.

Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T., and Haruki, K. (2000) Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic Escherichia coli serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* **38**: 2440-2442.

O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R. et Formal, S.B. (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., and Gilham, C. (2001a) 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. 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.

Olsen, S.J., Miller, G., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., and Mead, P. (2002) A waterborne outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis* **8**: 370-375.

Padhye, N.V., and Doyle, M.P. (1991) Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2693-2698.

Parry, S.M., and Salmon, R.L. (1998) Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis* **4**: 657-661.

Paton, A.W., Bourne, A.J., Manning, P.A., and Paton, J.C. (1995) Comparative toxicity and virulence of Escherichia coli clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect Immun* **63**: 2450-2458.

Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A., and Paton, J.C. (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-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, J.C., and Paton, A.W. (1998b) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clin Microbiol Rev* **11**: 450-479.

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., and Leinikki, P. (1999) Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* **122**: 1-5.

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.

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.

Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., and Lauwers, S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal Escherichia coli isolates. *J Clin Microbiol* **36**: 3317-3322.

Pohl, P. (1993) Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* **137**:325-333.

Posse, 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 lett. Microbiol.* **282**, 124-131.

Pradel, N. (2001) *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines : étude épidémiologique, recherche des caractéristiques des souches pathogènes par comparaison moléculaire et hybridation soustractive. Thèse de doctorat de 3ème cycle - Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne.

Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C., and Livrelli, V. (2001) Heterogeneity of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2460-2468.

Pupo, GM., Karaolis, DK., Lan, R., Reeves, PR. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies.

Rabatsky-Ehr, T., Dingman, D., Marcus, R., Howard, R., Kinney, A., and Mshar, P. (2002) Deer meat as the source for a sporadic case of Escherichia coli O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg Infect Dis* **8**: 525-527.

Ramachandran, V., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J., and Djordjevic, S.P. (2001) The common ovine Shiga toxin 2-containing Escherichia coli serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J Clin Microbiol* **39**: 1932-1937.

Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyck, A., Spika, J.S., Rahn, K., McFadden, K., Brouwer, A., Copps, A., and 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.

Roberts, T.A. (1995) Microbial growth and survival : developments in predictive modelling. *Int. Biodeter. Biodegr.* : 297-309.

Rodrigue, D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barrett, T.J., and Griffin, P.M. (1995) A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* **172**: 1122-1125.

Rowe, P.C., Orrbine, E., Lior, H., Wells, G.A., and McLaine, P.N. (1993) Diarrhoea in close contacts as a risk factor for childhood haemolytic uraemic syndrome. The CPKDRC co-investigators. *Epidemiol Infect* **110**: 9-16.

Ryan, C.A., Tauxe, R.V., Hosek, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W., Jr., Smith, P.W., Wright, G.F., and Blake, P.A. (1986) Escherichia coli O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* **154**: 631-638.

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

Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., 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.

Sharp, J.C., Ritchie, L.D., Curnow, J. et 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.

Scheutz, F., Olesen, B., Engberg, J., Munk Petersen, A., Molbach, K., Schiellerup, P., and Gerner- Smidt, 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.

Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.

Schmidt, H., and Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxinproducing Escherichia coli O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic- uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**: 2364-2367.

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., and Scutter, J. (1994) *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun Dis Rep CDR Rev* **5**: R86-90.

Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R., and Goni, F.M. (1999) Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* **31**: 1013-1024.

Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 5187-5197.

Sperandio, V., Li, C.C., and Kaper, J.B. (2002) Quorum-sensing Escherichia coli regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic E. coli. *Infect Immun* **70**: 3085-3093.

Steele, B.T., Murphy, N., Arbus, G.S., and Rance, C.P. (1982) An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J Pediatr* **101**: 963-965.

Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. et 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. et 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. et Brandt, L.J. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* **123**: 698-714.

Swerdlow, D.L., and Griffin, P.M. (1997) Duration of faecal shedding of Escherichia coli O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet* **349**: 745-746.

Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D., Jr., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer, A., Jr., Wells, J.G., and et al. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* **117**: 812-819.

Synge, B.A., Hopkins, G.F., Reilly, W.J., and Sharp, J.C. (1993) Possible link between cattle and E coli O157 infection in a human. *Vet Rec* **133**: 507.

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.I. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* **20**: 1-8.

Tarr, P.I., Tran, N.T., and Wilson, R.A. (1999) Escherichia coli O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot* **62**: 133-139.

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.

Thorpe, C.M., Smith, W.E., Hurley, B.P. et Acheson, D.W. 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun* **69**: 6140-6147.

Tilden, J., Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., ajkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., and Morris, J.G., Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**: 1142-1145.

Todd, W.T., and Dundas, S. (2001) The management of VTEC O157 infection. *Int J Food Microbiol* **66**: 103-110.

Trevena, W.B., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G., and Wray, C. (1999) Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and west Devon. *Commun Dis Public Health* **2**: 263-268.

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.

Uyttendaele, M., Jozwik, E., Tutenel, A., De Zutter, L., Uradzinski, J., Pierard, D., and Debevere, J. (2001a) 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.

Vaillant, V., and Espié, E. (2002) Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Etude cas-témoins 2000-2001. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France, pp. 61.

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.

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*. **145**(1-2), Pages 106-112.

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., (2007) Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), Thèse de doctorat d'université claude bernard – lyon 1 , 318 p

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*, **123**(1-3) 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 Microbioliology* **56**:219-225.

Wadolkowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E., and O'Brien, A.D. (1990b) 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.

Waters, J.R., Sharp, J.C., and Dev, V.J. (1994) Infection caused by Escherichia coli O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987-1991. *Clin Infect Dis* **19**: 834-843.

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.

Willshaw, G.A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirlwell, J., Cheasty, T., and Rowe, B. (1993) Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing Escherichia coli, particularly those of serogroup O157. *J Appl Bacteriol* **75**: 420-426.

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.

Yamasaki, C., Natori, Y., Zeng, X.T., Ohmura, M., Yamasaki, S., and Takeda, Y. (1999) Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett* **442**: 231-234.

Yoshida, T., Fukada, M., Koide, N., Ikeda, H., Sugiyama, T., Kato, Y., Ishikawa, N., and Yokochi, T. (1999) Primary cultures of human endothelial cells are susceptible to low doses of Shiga toxins and undergo apoptosis. *J Infect Dis* **180**: 2048-2052.

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, S., Meng, J., Doyle, M.P., Meinersman, R., Wang, G., and Zhao, P. (1996) A low molecular weight outer-membrane protein of Escherichia coli O157:H7 associated with adherence to INT407 cells and chicken caeca. *J Med Microbiol* **45**: 90-96.