

# Apport de la PCR en temps réel multiplex pour la détection des principaux STEC pathogènes dans les aliments

**Jordan MADIC**

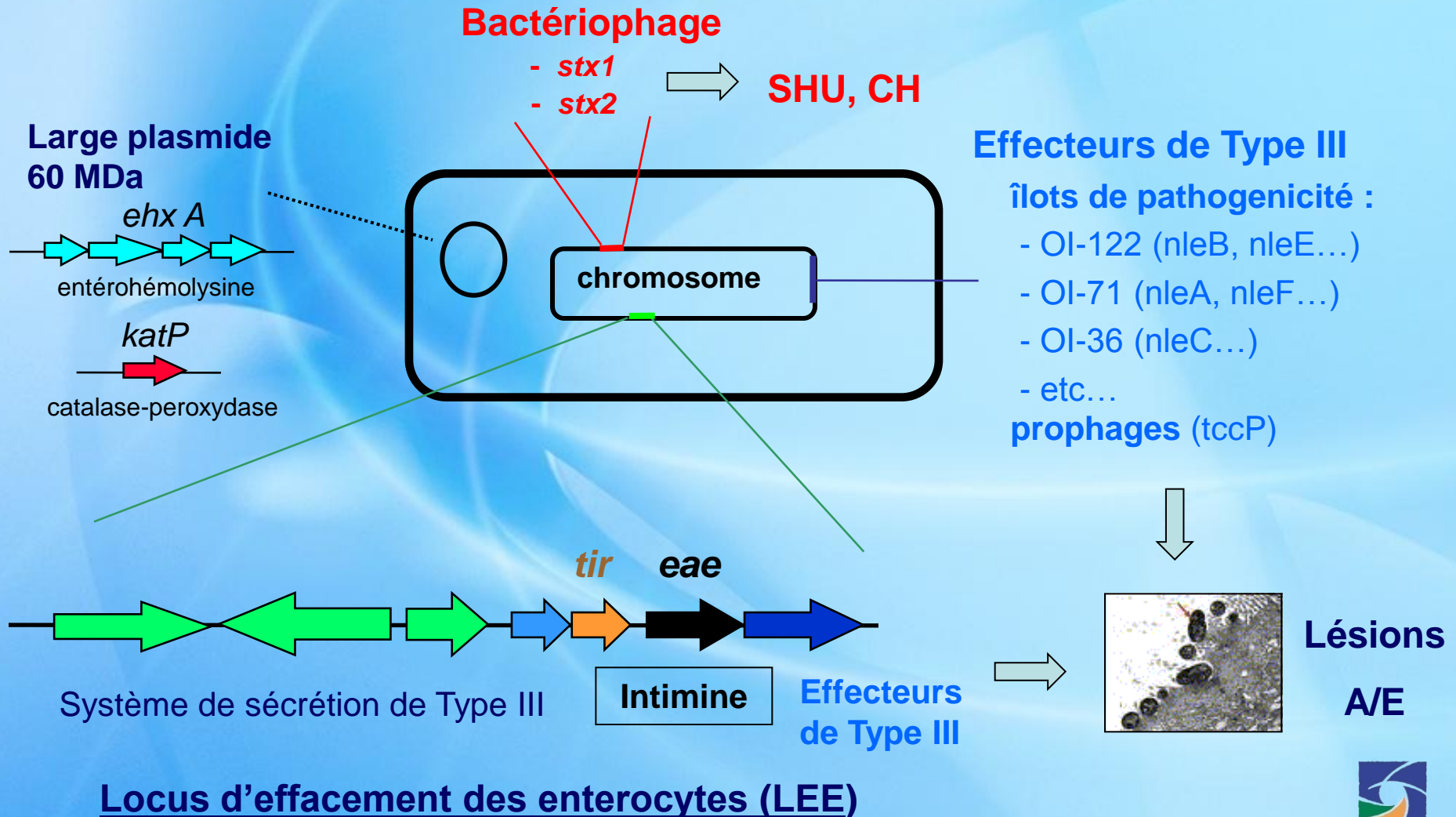
AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) / ACTILAIT

4<sup>èmes</sup> journées STEAK EXPERT

Angers, 23-24 juin 2010



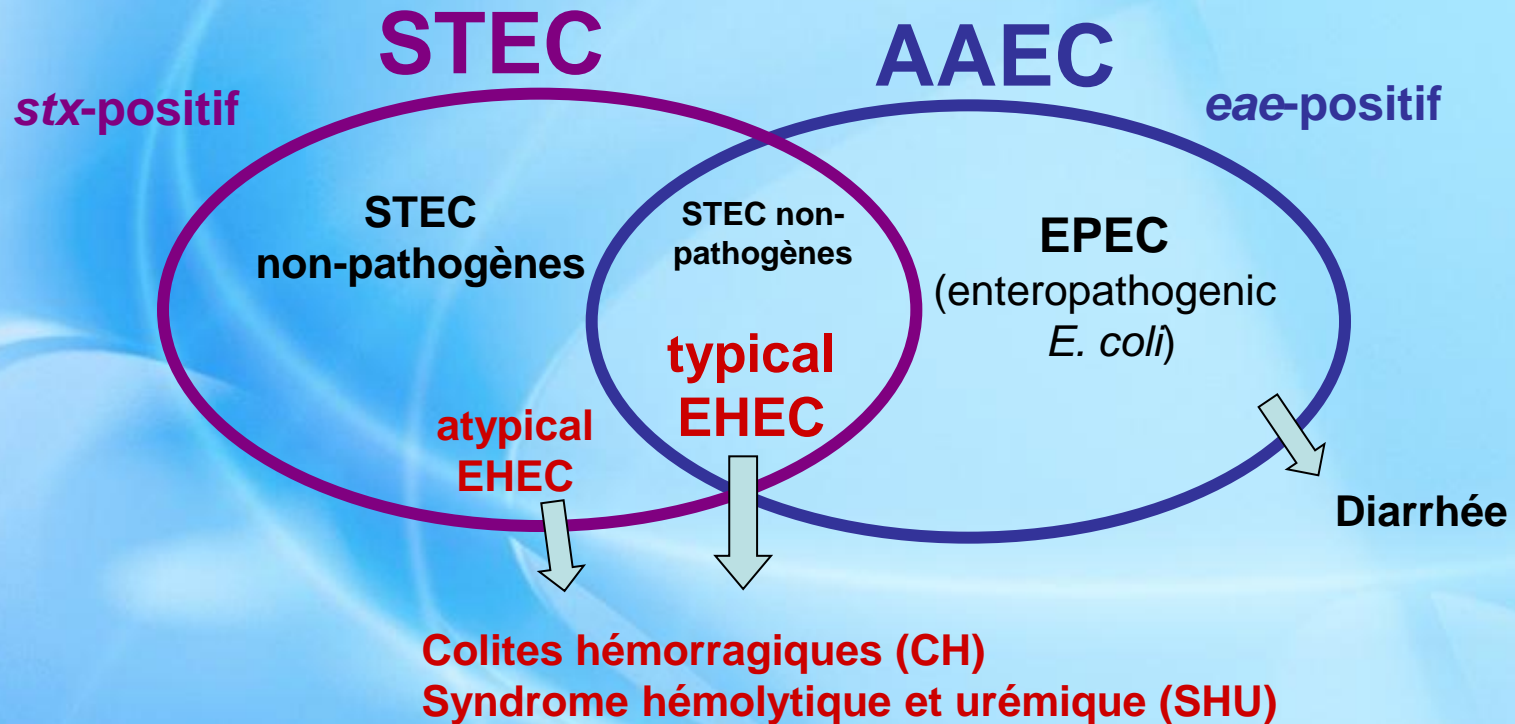
# Principaux facteurs de virulence des EHEC



# STEC, AEEC, EHEC et EPEC

(Shiga toxin-producing *E. coli*)

(attaching and effacing *E. coli*)



## Réservoirs



## Transmission



- Grande diversité génétique des STEC : > 400 sérotypes dont plus de 200 impliqués dans des infections humaines

**Table 1. Serotypes of non-O157 STEC isolated from humans**

O1:H-	O15:H27	O49:H-	O98:H8	O117:H19	O153:H11
O1:H1	O16:H-	O49:H10	O100:H25	O118:H12	O153:H12
O1:H2	O16:H6	O50:H-	O100:H32	<b>O118:H16</b>	<b>O153:H25</b>
O1:H7	O17:H18	O50:H7	<b>O101:H-</b>	O118:H30	<b>O154:H-</b>
O1:H20	O18:H-	O52:H23	O101:H9	O119:H-	<b>O154:H4</b>
O1:HNT	O18:H7	O55:H-	<b>O103:H-</b>	<b>O119:H5</b>	<b>O154:H19/20</b>
O2:H1	O18:H12	<b>O55:H6</b>	<b>O103:H2</b>	O119:H6	<b>O161:H-</b>
<b>O2:H5</b>	<b>O18:H7</b>	<b>O55:H7</b>	O103:H4	<b>O121:H-</b>	<b>O163:H19</b>
<b>O2:H6</b>	O20:H7	<b>O55:H10</b>	O103:H25	O121:H8	O165:H-
<b>O2:K1:H2</b>	<b>O21:H5</b>	<b>O55:H7</b>	O103:HNT	<b>O121:H19</b>	O165:H10
<b>O2:H7</b>	<b>O21:H7</b>	O60:H-	O104:H-	O123:H49	<b>O165:H19</b>
O2:H27	O22:H-	O65:H16	<b>O104:H2</b>	O124:H-	<b>O165:H25</b>
<b>O2:H29</b>	<b>O22:H1</b>	<b>O69:H-</b>	O104:H7	O125:H-	O166:H12
<b>O2:H44</b>	<b>O22:H8</b>	O70:H11	O104:H21	O125:H8	O166:H15
O4:H-	O22:H16	O73:H34	<b>O105ac:H18</b>	O126:H-	O166:H28
O4:H5	O22:H40	<b>O75:H-</b>	O105:H20	O126:H2	O168:H-
O4:H10	O23:H7	O75:H5	O109:H2	O126:H8	O169:H-
O4:H40	O23:H16	O76:H19	O110:H-	O126:H21	<b>O171:H-</b>
<b>O5:H-</b>	O25:H-	O77:H4	O110:H19	<b>O126:H27</b>	O171:H2
O5:H16	<b>O25:K2:H2</b>	O77:H18	<b>O111:H-</b>	O128:H-	O172:H-
<b>O6:H-</b>	<b>O26:H-</b>	<b>O79:H7</b>	<b>O111:H2</b>	<b>O128abc:H2</b>	ONT:H-
O6:H1	O26:H8	O80:H-	<b>O111:H8</b>	O128:H8	ONT:H2
O6:H2	<b>O26:H11</b>	O82:H-	O111:H30	O128:H12	ONT:H18
<b>O6:H4</b>	O26:H21	O82:H5	O111:H34	<b>O128:H25</b>	ONT:H21
O6:H28	O26:H32	O82:H8	O112:H21	O132:H-	<b>ONT:H25</b>
O6:H29	O27:H-	O83:H1	O113:H2	<b>O137:H41</b>	ONT:H47
O6:H31	O30:H2	O84:H2	O113:H4	O141:H-	O-rough:H-
O7:H4	O30:H21	<b>O85:H-</b>	O113:H7	O144:H-	<b>O-rough:H5</b>
O7:H8	O30:H23	<b>O85:H10</b>	<b>O113:H21</b>	<b>O145:H-</b>	<b>O-rough:H11</b>
O8:H-	O37:H41	<b>O85:H23</b>	O114:H4	O145:H16	<b>O-rough:H16</b>
O8:H14	O38:H21	O90:H-	<b>O115:H10</b>	<b>O145:H25</b>	O-rough:H20
<b>O8:H21</b>	O39:H4	O91:H-	O115:H18	<b>O145:H28</b>	O-rough:H21
<b>O9abc:H-</b>	O39:H8	<b>O91:H10</b>	O116:H19	O145:HNT	<b>OX3:H2</b>
O11:H49	O45:H-	O91:H14	O117:H-	O146:H21	<b>OX3:H21</b>
<b>O14:H-</b>	O45:H2	<b>O91:H21</b>	<b>O117:H4</b>	O146:H28	
O15:H-	O45:H7	O91:HNT	O117:H7	O150:H10	
<b>O15:H2</b>	<b>O48:H21</b>	O98:H-	O117:K1:H7	O153:H2	

En gras:  
sérotypes associés  
aux SHU

OMS (1998)

- Cinq sérotypes majeurs impliqués dans des cas humains graves et dans des épidémies : O26:H11/NM, O103:H2/NM, O111:H8/NM, O145:H28/NM, O157:H7/NM

# Classification des sérotypes de STEC en 5 séropathotypes

Classification basée sur la fréquence relative d'implication des sérotypes dans les maladies graves et les épidémies.

Séro pathotype	Incidence Relative	Epidémies	SHU, CH	Sérotypes	<i>eae</i>
A	haute	fréquente	oui	O157:H7, O157:NM	+
B	modérée	non fréquente	oui	O26:H11, O103:H2, O111:H8/NM, O145:NM	+
C	faible	rare	oui	O91:H21, O113:H21, O104:H21, etc...	+/-
D	faible	rare	non	multiple	+/-
E	non-humain	n.a.	n.a.	multiple	+/-

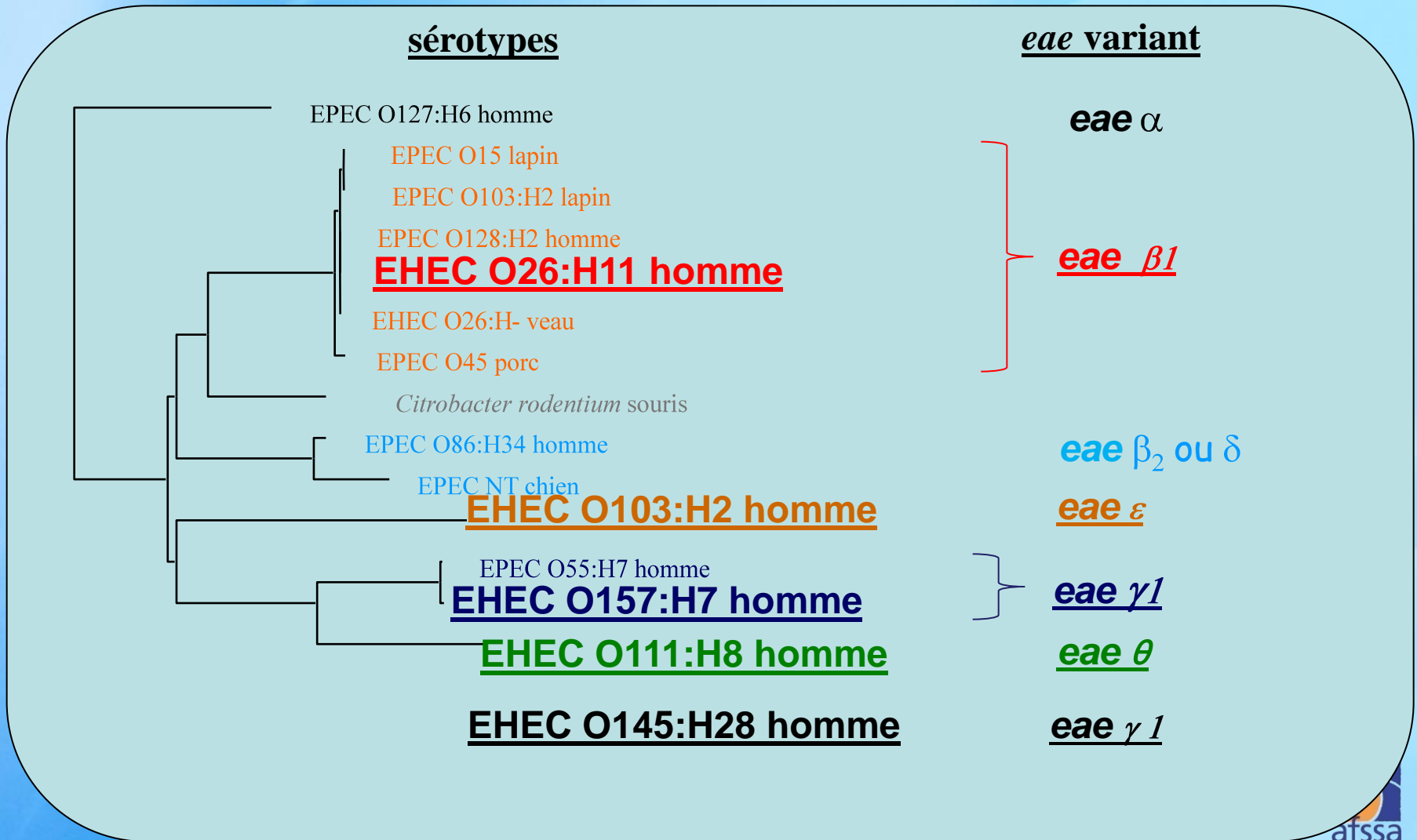
EHEC typique

Risque pour l'homme

EHEC atypique

Karmali *et al.* J. Clin. Mic. 2003. 41, 4930-4940.  
 Konczy *et al.* J. Bact. 2008. 190, 5832-5840.

# Association entre les 5 sérotypes majeurs d'EHEC et les variants du gène *eae*



D'après Oswald et al., 2000

# Détection des STEC pathogènes dans les aliments

## Principales difficultés :

- Faible quantité de STEC dans les produits (et faible dose infectieuse)
- Grande diversité des sérotypes impliqués dans des maladies humaines
- Absence of de propriétés biochimiques communes permettant leur isolement
- Détection de *stx* seulement : non approprié car les STEC ne sont pas TOUS pathogènes pour l'homme (ex.: STEC appartenant au sérotype E)

**STEC O157 :** Méthodes validées : ISO EN 16654  
- IMS (immuno-séparation magnétique)  
- gélose CT-SMAC pour l'isolement

**STEC non-O157 :** - Pas de méthode validée  
- IMS et milieux d'isolement disponibles pour les 5 sérogroupes majeurs (avec des efficacités variables)

# SPECIFICATION TECHNIQUE CEN/ISO

## Horizontal method for the detection of STEC belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups : Qualitative Real-time PCR-based method

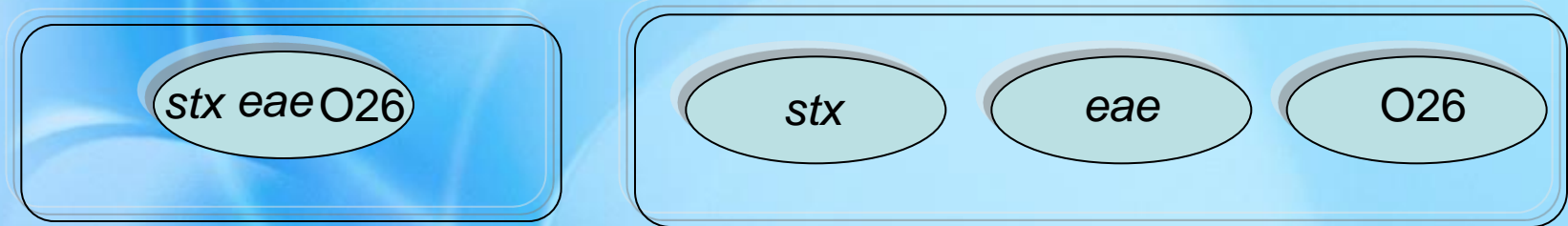
Proposée par le CEN STEC AD HOC group.  
En cours d'évaluation.

➤ Approche séquentielle : Echantillons alimentaires



# Principales difficultés concernant le criblage des aliments par PCR

- Les marqueurs génétiques de **STEC** détectés par PCR dans un aliment peuvent appartenir à des souches (non-pathogènes) différentes



- **Difficultés de confirmation : faible rendement de récupération des STEC à partir d'aliments contaminés**  
(flore bactérienne élevée, faible concentration de STEC, absence de milieux d'isolement validés pour les STEC non-O157 ...)
- Si une souche STEC ne peut être isolée :
  - ➔ Tests PCR : résultats **présomptifs**

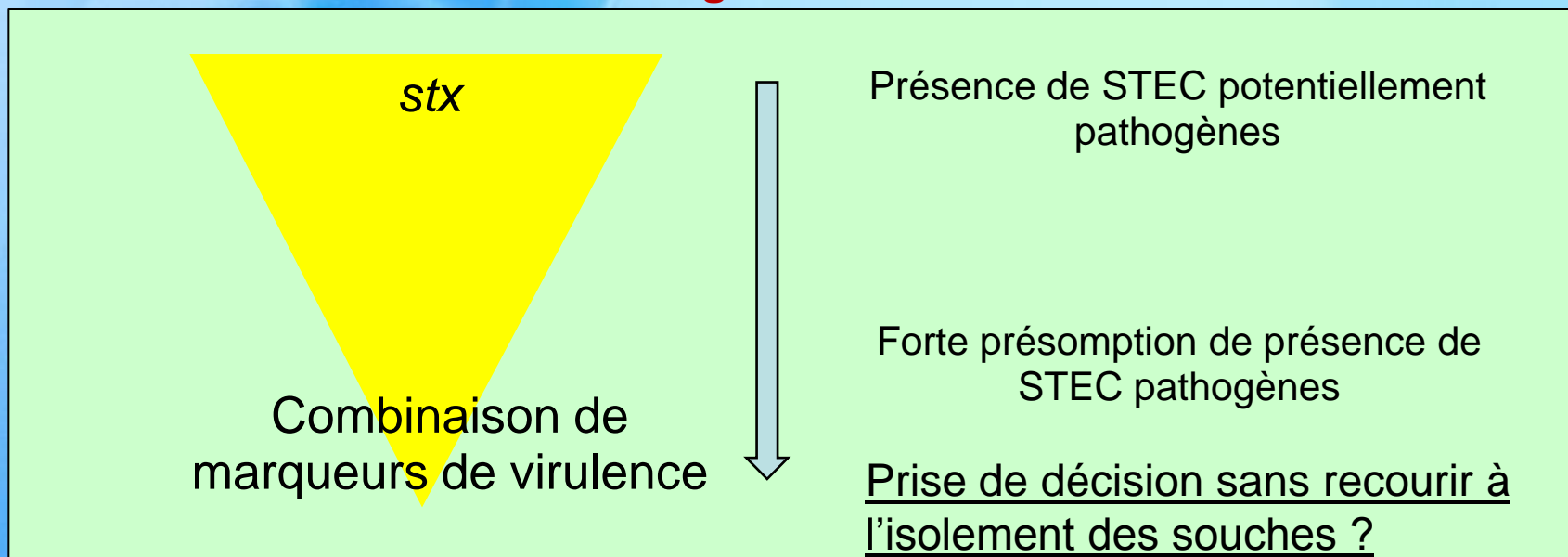
# Développement de tests PCR en temps réel et application pour la recherche de STEC pathogènes dans les aliments

- I. Développement de tests PCR en temps réel ciblant les variants du gène *eae* et les gènes flagellaires spécifiques des 5 sérotypes majeurs d'EHEC (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28)
- II. Recherche par PCR en temps réel des 5 sérotypes majeurs d'EHEC dans des fromages au lait cru
- III. Recherche par PCR en temps réel des 5 sérotypes majeurs d'EHEC dans des viandes hachées
- IV. Recherche par PCR en temps réel d'EHEC atypique O91:H21 dans des produits alimentaires

# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## OBJECTIFS

- Affiner la stratégie de détection par PCR via l'utilisation de tests PCR en temps réel ciblant des **combinaisons de marqueurs génétiques** appartenant aux 5 sérotypes majeurs d'EHEC :
  - gènes *stx*
  - gènes de synthèse des antigènes somatiques
  - gènes codant les antigènes flagellaires
  - variants du gène *eae*



# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

- Sondes Taqman marquées avec des fluorophores spécifiques

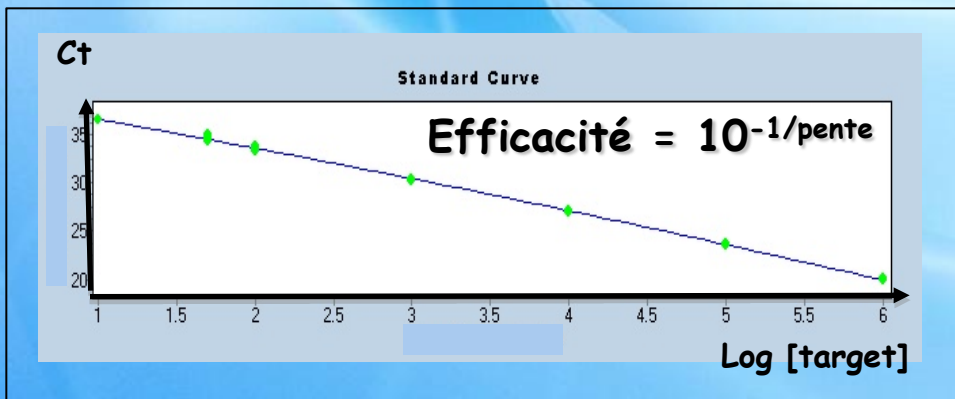
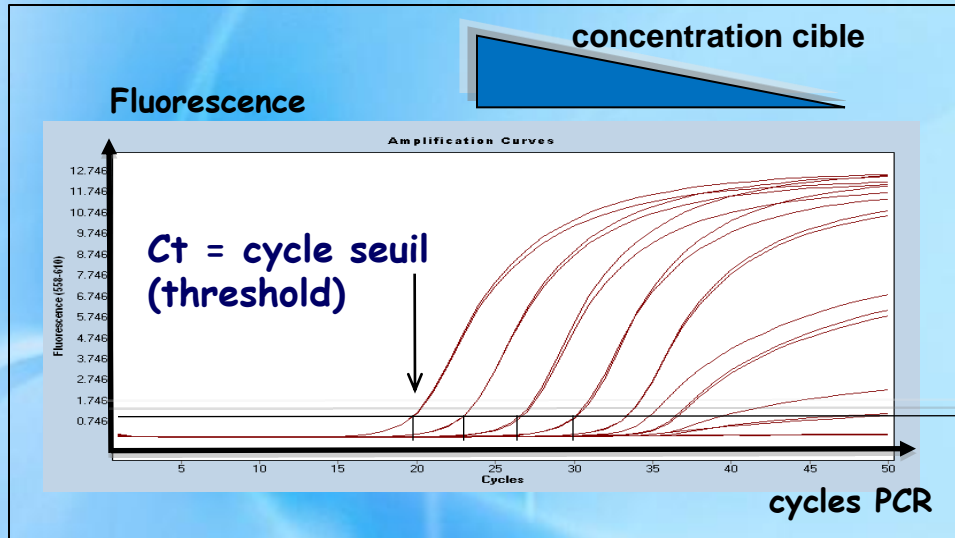
sérotypes d'EHEC	Cibles ADN			
	antigène somatique	gènes <i>stx</i>	variants <i>eae</i>	antigènes flagellaires
<b>EHEC O157:H7</b>	<i>rfbE</i> O157 (1)	<i>stx1 stx2</i> (1, 4)	<i>eae-γ1</i>	<i>fliC</i> H7
<b>EHEC O26:H11</b>	<i>wzx</i> O26 (1)		<i>eae-β1</i>	<i>fliC</i> H11
<b>EHEC O103:H2</b>	<i>wzx</i> O103 (2)		<i>eae-ε</i>	<i>fliC</i> H2
<b>EHEC O111:H8</b>	<i>wbdI</i> O111 (1)		<i>eae-θ</i>	<i>fliC</i> H8
<b>EHEC O145:H28</b>	<i>wzy</i> O145 (3)		<i>eae-γ1</i>	<i>fliC</i> H28

- (1) Perelle *et al.*, 2004,
- (2) Perelle *et al.*, 2005
- (3) Fratamico *et al.*, 2009
- (4) Auvray *et al.* 2009 (IAC)

**PCR multiplex  
(cette étude)**

# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Détermination de l'efficacité et de la sensibilité



Faible  
valeur  
de Ct



Forte  
concentration  
de cible

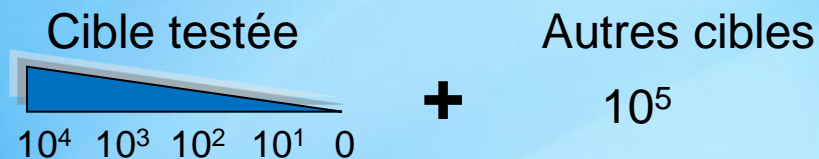
# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Détermination de l'efficacité et de la sensibilité

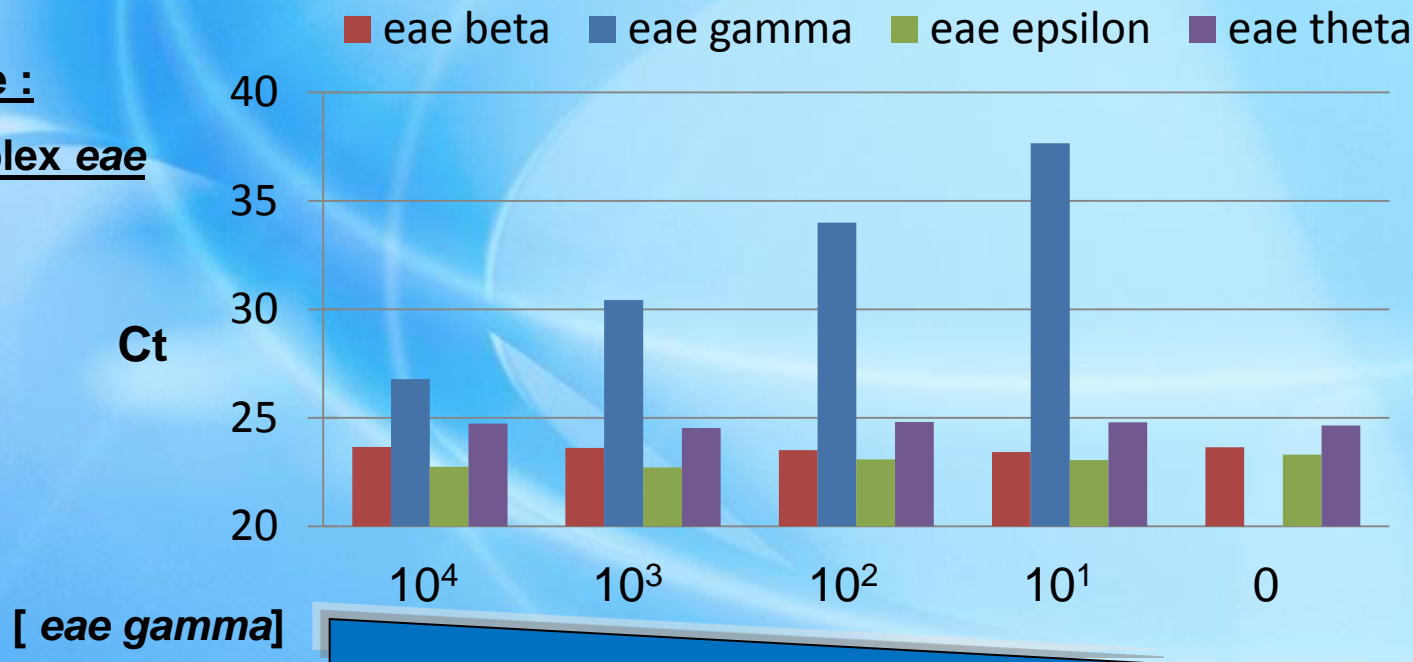
	Molecular Models	PCR Efficiency		Sensitivity	
		simplex (%)	multiplex (%)	targets / PCR reaction	genome equivalent / ml broth
Quadruplex	<i>eae</i> β1	93	91	5	250
	<i>eae</i> γ1	87	92		
	<i>eae</i> ε	94	92		
	<i>eae</i> θ	82	84		
Duplex	<i>fliC</i> - H2	89	87	5	250
	<i>fliC</i> - H8	93	93		
Duplex	<i>fliC</i> - H11	85	82	5	250
	<i>fliC</i> - H7	90	88		
Simplex	<i>fliC</i> - H28	90	na	10	500

# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Impact de cibles hautement concentrées sur la détection de cibles moins concentrées



Exemple :  
quadruplex eae



Optimisation pour le criblage rapide de matrices alimentaires complexes contenant plusieurs cibles à des concentrations différentes

# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Spécificité de la PCR quadruplex [ *eae* $\beta$ / *eae* $\gamma$ / *eae* $\epsilon$ / *eae* $\theta$ ]

201 souches testées : 92 *E. coli eae*<sup>+</sup>, 66 *E. coli eae*<sup>-</sup>, 43 autres

	No. strains	<i>eae</i> $\gamma$ 1	<i>eae</i> $\beta$ 1	<i>eae</i> $\epsilon$	<i>eae</i> $\theta$
<b><i>eae</i>- positive <i>E. coli</i></b>					
O157:H7 / H-	21	21	-	-	-
O145:H- / ND	12	12	-	-	-
O26:H11 / H- / ND	18	-	18	-	-
O103:H2	8	-	-	8	-
O111:H8 / H-	9	-	-	-	9
O55:H7	6	6	-	-	-
O5:H- / ND	6	-	6	-	-
O118:ND, O118:H16, O128:H2, Or:H11 O45:H2, O4:NM, O86:H40, O49:NM, O125:H6, O126:H6, O127:H6, O157:H45	12	-	4	2	1
<b><i>eae</i>- negative <i>E. coli</i></b> (38 serotypes)	66	-	-	-	-
<b>Non-<i>E. coli</i></b>	43	-	-	-	-

# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Spécificité des PCR en temps réel

[*fliC*-H2 / *fliC*-H8], [*fliC*-H7 / *fliC*-H11] , and *fliC*-H28

201 souches testées :158 *E. coli* (21 antigènes flagellaires différents), 43 non-*E.coli*

	Total	N° strains detected				
		H2	H8	H7	H11	H28
O103:H2 (n=8), other H2 strains (n=6)	14	13 <sup>(1)</sup>	-	-	-	-
O111:H-/ND (n=9), other H8 strains (n=8)	17	-	16 <sup>(2)</sup>	-	-	-
O157:H7 /H- (n=21), O55:H7 /ND (n=6)	27	-	-	27	-	-
O26:H11 /H- /ND (n=18), + Or:H11 (n=1)	19	-	-	-	19	-
O145:H- /ND (n=12), O116:H28 (n=1)	13	-	-	-	-	13
Other <i>E.coli</i>	68	-	-	-	-	-
Non- <i>E.coli</i>	43	-	-	-	-	-

(1) O111:H2 → *fliC*-H10

(2) O39:H8 → *fliC*-H21

déterminé par séquençage du gène *fliC*

Wang, L *et al.* Species-wide variation in the Escherichia coli flagellin (H-antigen) gene. J Bacteriol. 2003



# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Evaluation des tests PCR en temps réel à partir de fromages contaminés artificiellement

- Contamination artificielle de fromages pasteurisés avec des cultures calibrées de STEC appartenant aux 5 sérotypes majeurs

### Protocole expérimental

**Echantillon**  
25g de produit  
+ bouillon d'enrichissement

O157:H7 (eae  $\gamma$ 1)  
O26:H11 (eae  $\beta$ 1)  
O103:H2 (eae  $\epsilon$ )  
O111:[H8] (eae  $\theta$ )  
O145:[H28] (eae  $\gamma$ 1)

**Enrichissement**

Extraction ADN  
automatisée

**Triplicat**

**2 niveaux de contamination (1-5 et 10-50 UFC/25g)  
Témoin négatif (non contaminé)**

**Tests PCR :**

- quadruplex eae
- duplex *fliC*-H2/8 and *fliC*-H7/11
- simplex *fliC*-H28
- marqueurs de sérogroupes (contrôles)

# Fromages artificiellement contaminés: Résultats des PCR en temps réel

Cible ADN	UFC / 25 g						
	0	1-5		10-50			
<i>wzx</i> <sub>O26</sub>	-	+ (23.67 ± 0.14)	+ (31.30 ± 0.07)	+ (28.44 ± 0.16)	+ (28.41 ± 0.36)	+ (27.09 ± 0.13)	+ (28.21 ± 0.27)
<i>fliC</i> <sub>H11</sub>	-	+ (25.79 ± 0.03)	+ (34.14 ± 0.06)	+ (31.53 ± 0.24)	+ (30.67 ± 0.49)	+ (29.08 ± 0.23)	+ (30.64 ± 0.17)
<i>eae-β1</i>	-	+ (23.98 ± 0.03)	+ (35.06 ± 0.09)	+ (31.19 ± 0.08)	+ (31.43 ± 0.24)	+ (29.54 ± 0.06)	+ (31.17 ± 0.19)
<i>wzx</i> <sub>O103</sub>	-	+ (23.45 ± 0.16)	+ (22.22 ± 0.16)	+ (22.46 ± 0.11)	+ (19.97 ± 0.25)	+ (20.84 ± 0.22)	+ (19.83 ± 0.15)
<i>fliC</i> <sub>H2</sub>	-	+ (26.25 ± 0.14)	+ (24.36 ± 0.18)	+ (24.10 ± 0.08)	+ (20.60 ± 0.39)	+ (21.95 ± 0.09)	+ (20.21 ± 0.23)
<i>eae-ε</i>	-	+ (21.02 ± 0.06)	+ (19.32 ± 0.10)	+ (20.15 ± 0.07)	+ (16.64 ± 0.32)	+ (17.09 ± 0.04)	+ (17.02 ± 0.22)
<i>wbdI</i> <sub>O111</sub>	-	+ (19.29 ± 0.35)	+ (18.49 ± 0.14)	+ (19.68 ± 0.05)	+ (17.64 ± 0.38)	+ (17.74 ± 0.19)	+ (18.24 ± 0.06)
<i>fliC</i> <sub>H8</sub>	-	+ (19.01 ± 0.07)	+ (17.73 ± 0.01)	+ (19.25 ± 0.02)	+ (17.67 ± 0.42)	+ (17.74 ± 0.19)	+ (18.38 ± 0.31)
<i>eae-θ</i>	-	+ (18.06 ± 0.02)	+ (16.89 ± 0.10)	+ (18.22 ± 0.13)	+ (18.30 ± 0.31)	+ (18.56 ± 0.04)	+ (19.03 ± 0.26)
<i>ihpI</i> <sub>O145</sub>	-	+ (25.55 ± 0.19)	+ (26.00 ± 0.20)	+ (26.56 ± 0.19)	+ (27.80 ± 0.26)	+ (26.90 ± 0.22)	+ (28.46 ± 0.02)
<i>fliC</i> <sub>H28</sub>	-	+ (27.80 ± 0.06)	+ (27.86 ± 0.05)	+ (28.85 ± 0.08)	+ (27.55 ± 0.22)	+ (26.72 ± 0.21)	+ (29.26 ± 0.26)
<i>rfbE</i> <sub>O157</sub>	-	+ (16.30 ± 0.15)	+ (16.68 ± 0.14)	+ (16.98 ± 0.27)	+ (16.33 ± 0.44)	+ (16.63 ± 0.35)	+ (16.47 ± 0.30)
<i>fliC</i> <sub>H7</sub>	-	+ (17.00 ± 0.02)	+ (17.14 ± 0.01)	+ (17.93 ± 0.22)	+ (18.12 ± 0.58)	+ (18.28 ± 0.27)	+ (18.46 ± 0.25)
<i>eae-γ1</i>	-	+ (15.84 ± 0.03)	+ (16.03 ± 0.11)	+ (16.77 ± 0.10)	+ (19.19 ± 0.27)	+ (20.33 ± 0.08)	+ (19.33 ± 0.30)

Niveau d'enrichissement des STEC = sérotype-dépendent :

O26:H11, O145:H28 → 3x10<sup>5</sup> et 2.2x10<sup>5</sup> cellules/ml de bouillon

O103:H2, O111:H8, O157:H7 → > 5x10<sup>7</sup> cellules/ml de bouillon

Nécessité d'optimiser le milieu d'enrichissement pour les 5 sérotypes.



# I. Développement de tests PCR en temps réel multiplex

## Référence

**Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen)**

***fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic**

***Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and**

**O157:H7**

J. Madic<sup>1,2</sup>, C. Peytavin de Garam<sup>1</sup>, N. Vingadassalon<sup>1,2</sup>,

E. Oswald<sup>3,4,5</sup>, P. Fach<sup>1</sup>, E. Jamet<sup>2</sup>, F. Auvray<sup>1</sup>

Accepté pour publication dans *Journal of Applied Microbiology*

## II. Evaluation des tests PCR à partir de fromages au lait cru naturellement contaminés

### Objectifs:

- Déterminer la **prévalence** des **marqueurs génétiques de STEC pathogènes** dans des fromages au lait cru.
- Pour les échantillons contenant **différents marqueurs** de STEC, déterminer l'origine de ces marqueurs (**provenance d'une même souche ?**)
- Evaluer la pertinence de l'**approche séquentielle de criblage** basée sur la détection de **combinaisons de marqueurs génétiques d'EHEC**

## II. Evaluation des tests PCR à partir de fromages au lait cru naturellement contaminés

**400 samples**  
Fromages au lait cru (pâtes molles et chèvres frais)  
collectés dans des fromageries (mars - août 2009)

**Enrichissement** (protocole Possé *et al.*, 2008)

**Extraction ADN automatisée**

**RTi-PCR *stx***  
+ contrôle interne  
d'amplification (IAC)  
(Auvray *et al.*, 2009)

**RTi-PCR [O26, O103,  
O111, O145, O157]**  
(Perelle *et al.*, 2004;  
Fratamico *et al.* 2009)

**RTi-PCR *eae***  
(Nielsen *et al.*,  
2003)

**RTi-PCR  
*eae* [β, γ, ε, θ]**  
(Cette étude)

**RTi-PCR  
*fliC*-[H2, H7,  
H8, H11, H28]**  
(Cette étude)

**Isolement des souches**

**IMS** (échantillons positifs pour au moins  
une association « séro groupe / variant  
*eae* »)

**Hybridation sur colonies** (échantillons  
avec faible valeur de Ct *stx* (Ct<30))

## II. Résultats (1) : prévalence de marqueurs génétiques d'EHEC

	N. échant.	%
<b><i>stx</i> +</b>	119	29,8
<b><i>eae</i> +</b>	149	37,3
<b><i>eae</i> [<math>\beta</math>, <math>\gamma</math>, <math>\varepsilon</math>, <math>\theta</math>] +</b>	107	31,1
<b>O [O26, O103, O111, O145, O157] +</b>	133	33,3
<b><i>fliC</i> [H2, H7, H8, H11, H28] +</b>	294	85,5



	N. échant.	%
<b><i>wzx</i> O103</b>	95	23,8
<b><i>wzx</i> O26</b>	45	11,3
<b><i>rfbE</i> O157</b>	20	5,0
<b><i>wzy</i> O145</b>	4	1,0
<b><i>wbdI</i> O111</b>	1	0,3

	N. échant.	%
<b><i>eae</i> <math>\beta</math></b>	68	19,8
<b><i>eae</i> <math>\theta</math></b>	54	15,7
<b><i>eae</i> <math>\varepsilon</math></b>	8	2,3
<b><i>eae</i> <math>\gamma</math></b>	4	1,2

## II. Résultats (2) : associations de marqueurs génétiques d'EHEC

	Association détectée	N. échant.	%
EHEC O103:H2 eae $\epsilon$	stx / wzxO103 / eae	31	7.8
	stx / wzxO103 / eae $\epsilon$	5	1.3
	stx / wzxO103 / eae $\epsilon$ / fliC-H2	5	1.3
EHEC O26:H11 eae $\beta$	stx / wzxO26 / eae	22	5.5
	stx / wzxO26 / eae $\beta$	19	4.8
	stx / wzxO26 / eae $\beta$ / fliC-H11	19	4.8
EHEC O157:H7 eae $\gamma$	stx / rfbO157 / eae	4	1
	stx / rfbO157 / eae $\gamma$	1	0.3
	stx / rfbO157 / eae $\gamma$ / fliC-H7	1	0.3
EHEC O145:H28 eae $\gamma$	stx / wzyO145 / eae	2	0.5
	stx / wzyO145 / eae $\gamma$	1	0.3
	stx / wzyO145 / eae $\gamma$ / fliC-H28	1	0.3
EHEC O111:H8 eae $\theta$	stx / wbdI O111/ eae	0	0



10 échantillons: *E.coli*  
O26:H11 eae  $\beta^+$  isolé



7 stx<sup>+</sup> 3 stx<sup>-</sup>

## II. Résultats (3) : associations de marqueurs génétiques d'EHEC

Combinaisons détectées	N. échant.	%
stx+	119	29.8
stx+ eae+	68	17.0
stx+ [O26 O103 O111 O145 O157]+	57	14.3
stx+ [O26 O103 O111 O145 O157]+ eae+	45	11.3
<b>Association « stx/O/eae-variant »</b> - stx/O145/eae $\gamma$ 1 - stx/O103/eae $\epsilon$ - stx/O157/eae $\gamma$ 1 - stx/O26/eae $\beta$ 1 - stx/O111/eae $\theta$	26*	6.5

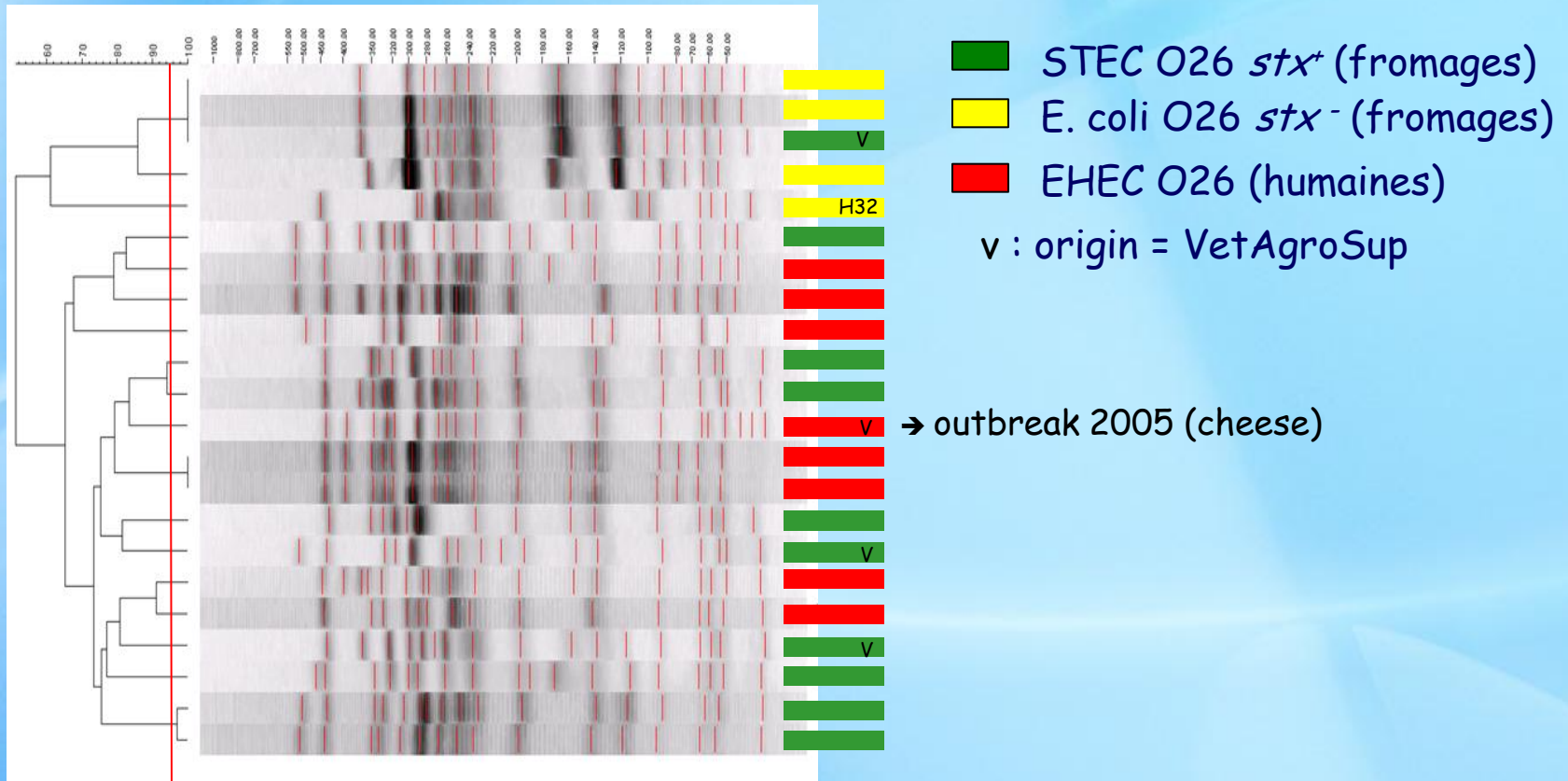
\* : deux associations ont été détectée dans un même échantillon

## II. Résultats (4): caractérisation des souches isolées

Sérotype*	eae	stx-type	ehx	katP	nleA	pagC	ent	efa1	efa2
O26:H-	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H11	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H11	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	stx1 + stx2	+	+	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	stx1	+	+	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	-	-	-	+	-	+	+	+
(O26):H-	eaeβ1	-	-	-	+	-	+	+	+
O26:H-	eaeβ1	-	-	-	+	-	+	+	+
O26:H32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O2:H27	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
Or:H10	-	stx1	-	-	-	-	-	-	-
O174:H2	-	stx1 + stx2	+	-	-	+	-	-	-
O8:H19	-	stx2	+	-	-	-	-	-	-
O166:H-	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
O91:H10	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
O2:H27	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
Or:H10	-	stx1	-	-	-	-	-	-	-
O+:H10	-	stx1	-	-	-	-	-	-	-
O2:H27	-	stx2	-	-	-	-	-	-	+
O128ab:H-	-	stx1	+	-	-	-	-	-	-
O175:H16	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
O8:H19	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
O175:H16	-	stx2	-	-	-	-	-	-	-
O178:H19	-	stx2	-	-	-	+	-	-	-
O103:H25	eaeθ	-	+	-	-	+	+	+	+
O133:H29	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Même profil  
de virulence  
que les  
EHEC  
O26:H11

## II. Résultats (5): analyse par PFGE des *E. coli* O26



- Grande diversité génétique des souches O26
- Pas de profils identiques entre souches de fromages et souches humaines (cutoff 95%)

## II. Conclusion – perspectives (1)

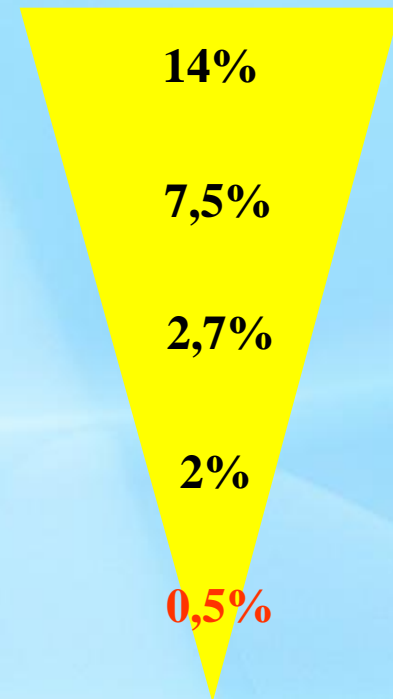
- **Prévalence de *fliC*-H2/H7/H8/H11/H28 supérieure à 80% :**
  - ➔ les antigènes flagellaires ne sont pas assez sélectifs pour être utilisés dans le cadre d'une recherche des EHEC dans les aliments.
  - ➔ les tests PCR en temps réel spécifiques des gènes *fliC* seront plus utiles pour le sérotypage moléculaire de souches isolées (en particulier les souches non-motiles).
- **Pertinence de la recherche des marqueurs *stx*, O26/O103/O111/O145/O157 et de leurs variants *eae* correspondants:**
  - ➔ la prise en compte des **combinaisons O26/*eae* $\beta$ , O103/*eae* $\epsilon$ , O111/*eae* $\theta$ , O145/*eae* $\gamma$  and O157/*eae* $\gamma$**  accroît la précision du diagnostic EHEC dans les fromages au lait cru.

## II. Conclusion – perspectives (2)

- **Combinaison de marqueurs la plus fréquente dans les fromages au lait cru : → *stx/O26/eaeβ***
  - ➔ Confirmation de la présence de *stx*, O26 et *eae β* au sein d'une même souche pour 7 (37%) sur 19 échantillons.
- **1.75% des échantillons : isolement de STEC O26:H11 = souches pathogènes selon l'avis de l'Afssa 2010.**
  - ➔ s'agissant de STEC O26:H11 *stx1*-positifs, niveau de virulence moins élevé comparé à des souches *stx2+* ??
- **0.75% des échantillons : isolement d'*E.coli* O26:H11 *stx*-négatif**
  - = EPEC atypiques ?
  - = STEC O26:H11 ayant perdu leur gène *stx* durant l'isolement ? durant la fabrication des fromages ?

### III. Evaluation des tests PCR à partir de viandes hachées naturellement contaminées

	VH réfrigérées 2006	VH surgelées 2007	TOTAL
No. d'échantillons	164	251	415
<i>stx</i> <sup>+</sup>	27	32	59
<i>stx</i> <sup>+</sup> et [5 sérogroupes] <sup>+</sup>	9	22	31
<i>stx</i> <sup>+</sup> et <i>eae</i> <sup>+</sup>	2	9	11
<i>stx</i> <sup>+</sup> et [5 sérogroupes] <sup>+</sup> et <i>eae</i> <sup>+</sup>	1	8	9
<i>stx</i> <sup>+</sup> et [5 sérogroupes] <sup>+</sup> et variants <i>eae</i> associés	0	2 <sup>*</sup>	2 <sup>*</sup>

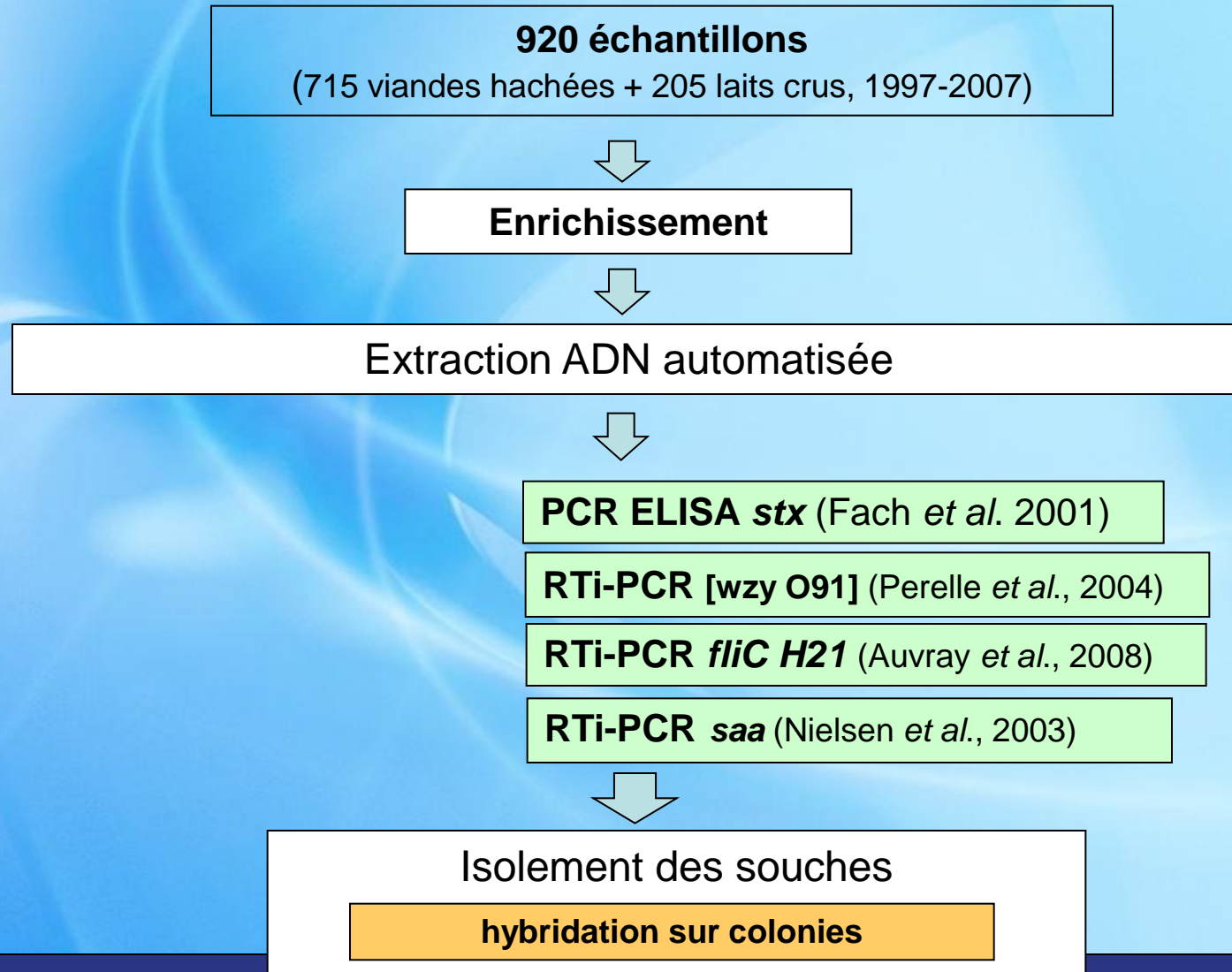


Souches isolées

12 *E. coli* O26 (n=3), O103 (n= 3), O145 (n=6) : 100% *stx*-négatifs  
23 STEC (autres que O157/O26/O103/O111/O145)



# IV. Criblage de produits alimentaires pour la présence d'EHEC atypique O91:H21.

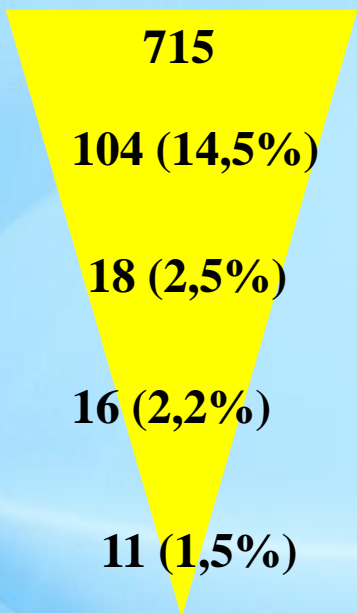


# IV. Criblage de produits alimentaires pour la présence d'EHEC atypique O91:H21.

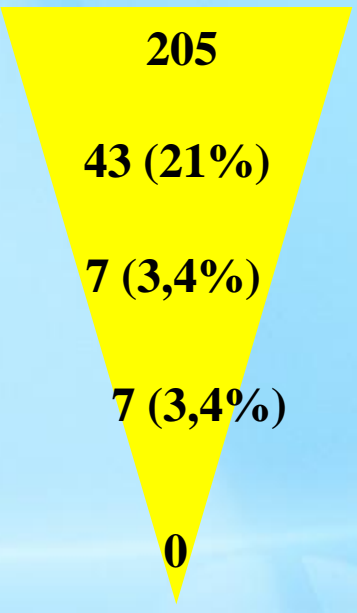
## Résultats:

No. d'échant. positifs pour :
<i>stx</i>
<i>stx</i> et <i>wzyO91</i>
<i>stx</i> , <i>wzyO91</i> et <i>fliC H21</i>
<i>stx</i> , <i>wzyO91</i> , <i>fliC H21</i> et <i>saa</i>

Viandes hachées



Laits crus



No. de STEC O91:H21 *saa*-positifs :

2

0

## Référence:

Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254

ORIGINAL ARTICLE

**Screening of food raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21**

J. Madic<sup>1,2</sup>, C. Lecureuil<sup>1</sup>, F. Dilasser<sup>1</sup>, S. Derzelle<sup>1</sup>, E. Jamet<sup>2</sup>, P. Fach<sup>1</sup> and F. Auvray<sup>1</sup>



# Remerciements



Frédéric AUVRAY

Carine PEYTAVIN de GARAM, Noémie VINGADASSALON

Jocelyne TACHE, Nadine BELIN

**Equipe Qualité Microbiologique des Aliments  
AFSSA- LERQAP, MAISONS ALFORT**

Patrick FACH

**AFSSA- LERQAP, MAISONS ALFORT**



Emmanuel JAMET,

**Laboratoire d'Etude et d'Application des  
Microorganismes d'Intérêt Laitier (LEAMIL), LA  
ROCHE SUR FORON.**



Hubert BRUGERE, Eric OSWALD,

**Equipe pathogénie moléculaire et cellulaire des  
*Escherichia coli*,  
UMR960 INRA ENV TOULOUSE**



Estelle LOUKIADIS, Delphine THEVENOT

**VetAgroSup LYON**



Flemming SCHEUTZ

***E.coli* and *Klebsiella* reference laboratory (WHO),  
STATENS SERUM INSTITUT, DANEMARK.**

