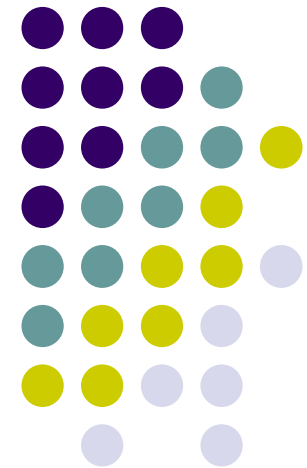


Portage et excrétion d'"EHEC" dans le troupeau bovin en France

- connaissances nécessaires pour une meilleure
maîtrise de ces dangers dans la filière de production
de viande hachée -

SteakExpert 2011
Etat d'avancement de l'étude
au 22 juin 2011



Partenaires de l'étude



- Institut de l'élevage, Service Viande, Villers Bocage
Philippe Cartier, Valérie Hardit
- ENVT, USC INRA - U1043 INSERM, Equipe 11 Pathogénie moléculaire et cellulaire des infections à *E. coli*, Toulouse
Hubert Brugère, Delphine Bibbal, Monique Kérourédan
- ANSES, LSA, EDB, Maisons Alfort
Frédéric Auvray, Carine Peytavin
- VetAgroSup, LMAP, LNR STEC, Marcy l'Etoile
Estelle Loukiadis, Delphine Thévenot, Frank Ferré
- ANSES, Laboratoire d'études et de recherche en pathologie bovine et hygiène des viandes, Lyon
Jean-Yves Madec, Emilie Gay

Cofinancement INTERBEV et FRANCEAGRIMER

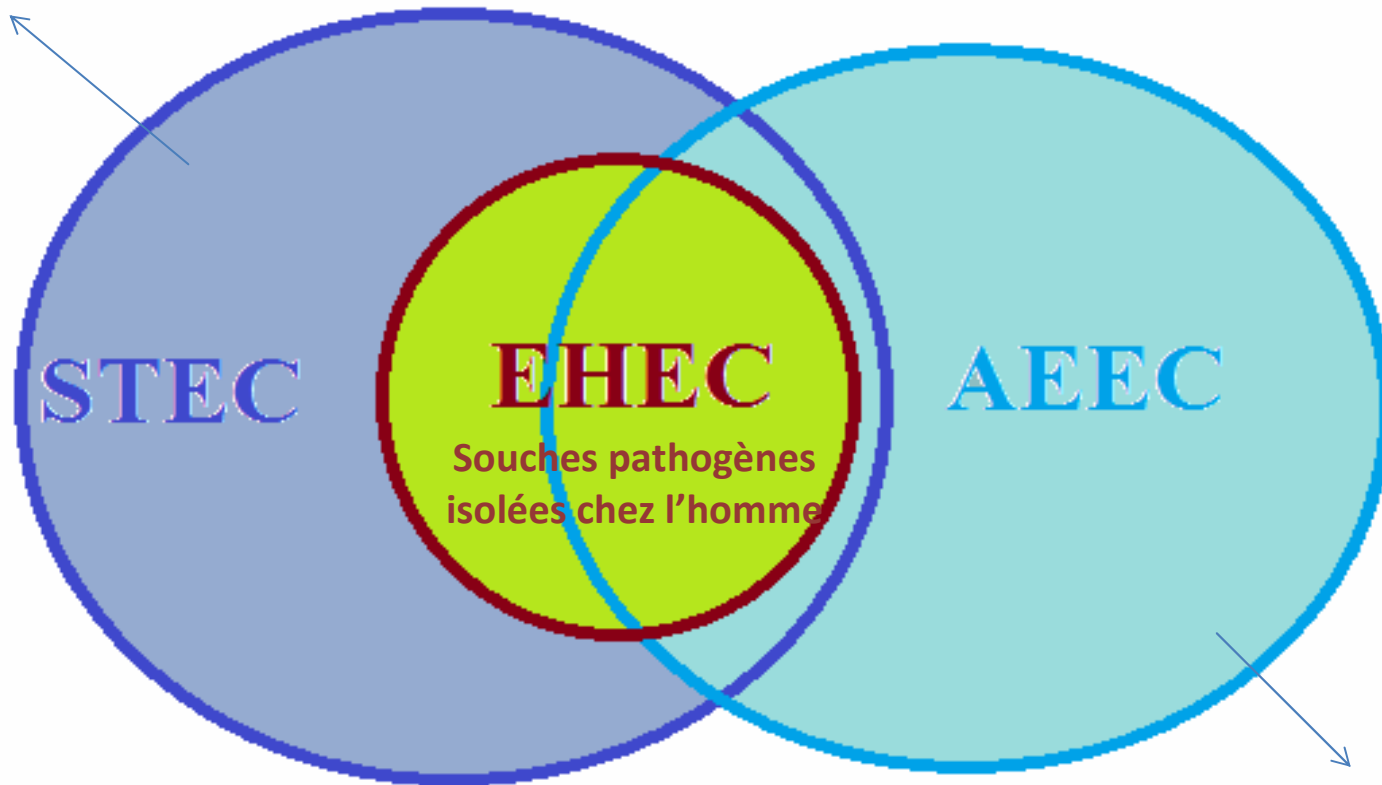
Objectifs de l'étude



- Evaluer la prévalence des 5 «EHEC typiques majeurs» (ANSES) au sein du troupeau bovin en France.
- Comparer et valider des techniques d'identification des «EHEC majeurs»
- Evaluation du portage par catégorie de bovin (Jeune bovin, Vache laitière, Vache allaitante) et par saison
- Identification d'animaux super-excréteurs
- Identification d'élevage «à risque »

Les EHEC

STEC : *E. coli* producteurs de
Shigatoxines codées par les gènes *stx*



AEEC : *E. coli* responsables des lésions
d'**attachement et effacement** (effecteurs
codés par l'îlot de pathogénicité **LEE** porteur
du gène *eae* codant pour l'**intimine**)

Les cinq EHEC typiques majeurs (ANSES)



O157:H7	<i>rfbE</i> _{O157}	<i>flic</i> _{H7}	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae</i> γ
O26:H11	<i>wzx</i> _{O26}	<i>flic</i> _{H11}	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae</i> β
O145:H28	<i>ihp1</i> _{O145}	<i>flic</i> _{H28}	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae</i> γ
O103:H2	<i>wzx</i> _{O103}	<i>flic</i> _{H2}	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae</i> ϵ
O111:H8	<i>wbd1</i> _{O111}	<i>flic</i> _{H8}	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae</i> ϑ

antigène
somatique

antigène
flagellaire

profil de
virulence

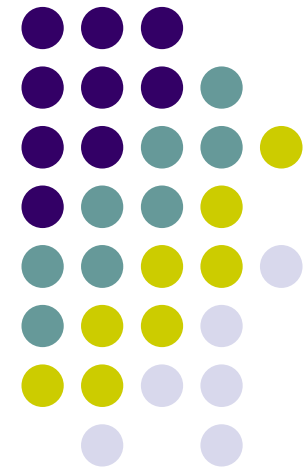
Historique de l'étude



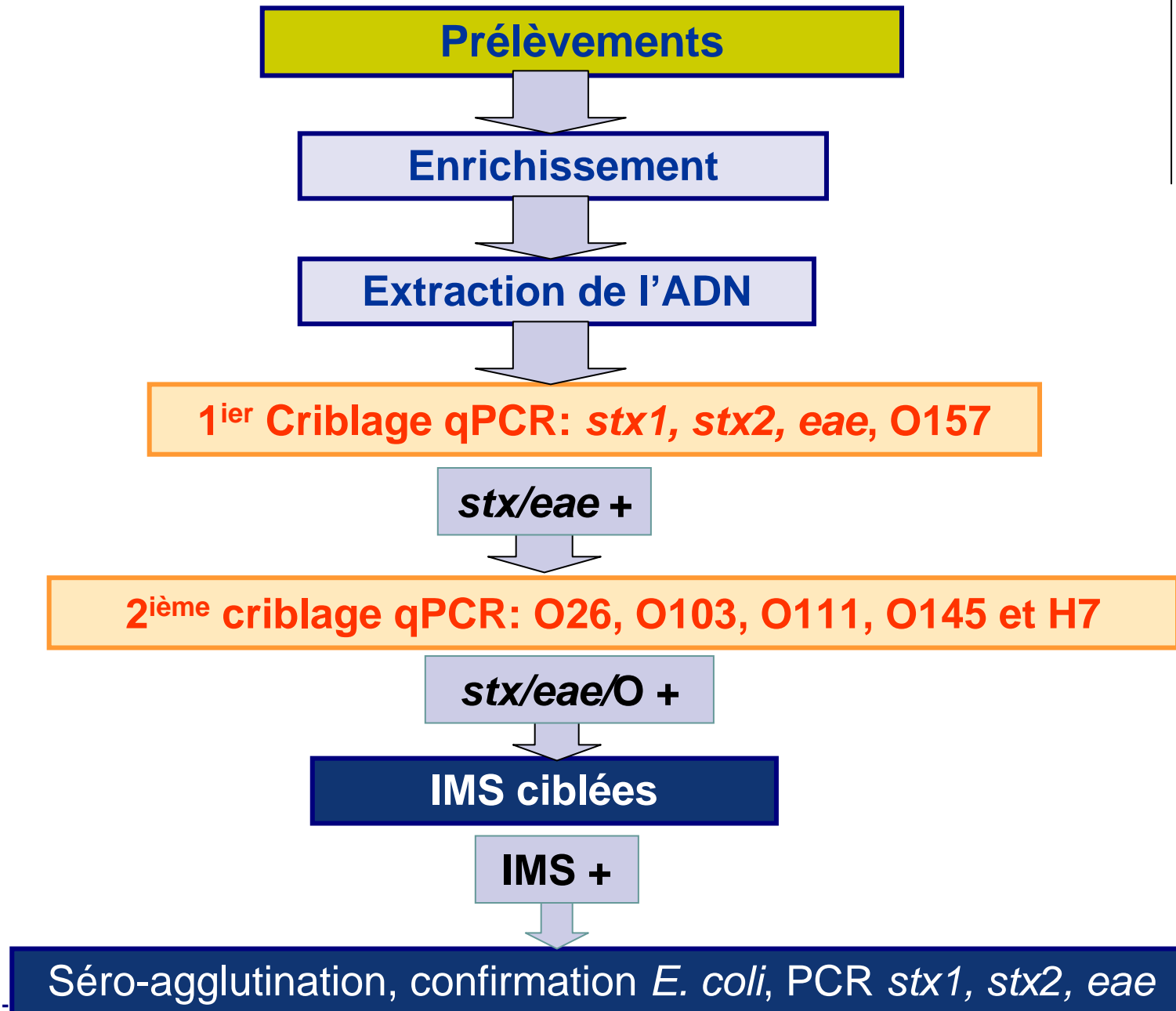
- Début 2010 : Mise au point / validation des différentes techniques
- 25/05/2010 : 1^{ère} campagne de prélèvement (campagne A)
- 31/08/2010 : réunion avec l'ensemble des partenaires afin de faire les réajustements nécessaires sur le projet
Mise au point nouvelles techniques qPCR
- 19/10/2010 : lancement des campagnes de prélèvement à raison de 1 campagne/mois
- 22/06/2011 : 11 campagnes ont été réalisées (A à K), il en reste 1 (semaine 26)

Résultats campagne A

**conséquences et
ajustements du protocole
de l'étude**



Campagne A : démarche expérimentale



Réalisation pratique des prélèvements

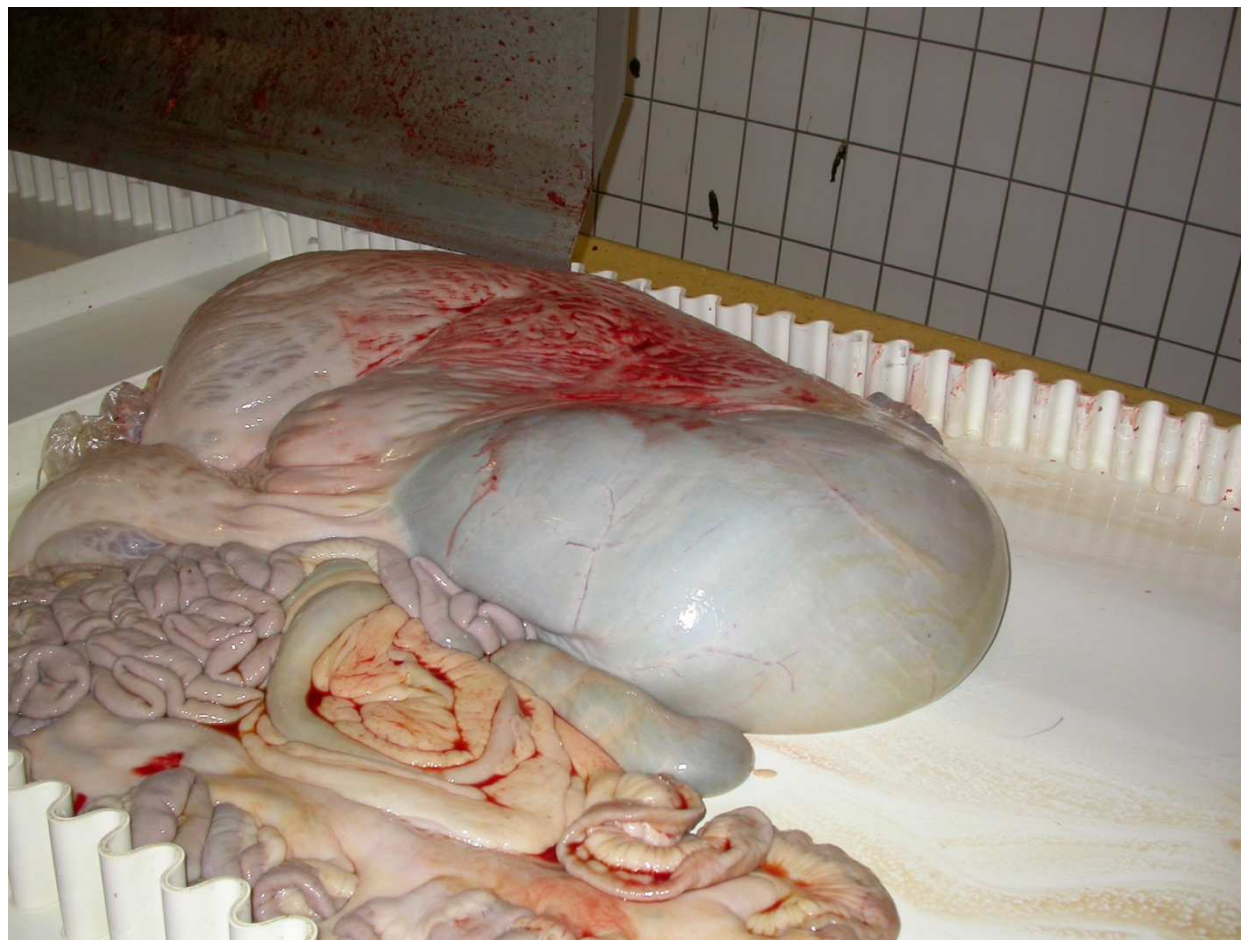


- Une « hantise » : transfert des contaminations d'un échantillon à un autre via le préleveur
- Mesures prises :
 - personnels formés et en nombre suffisant
 - matériel à usage unique
 - désinfection et rinçage des mains entre chaque prélèvement.



Le matériel de prélèvement



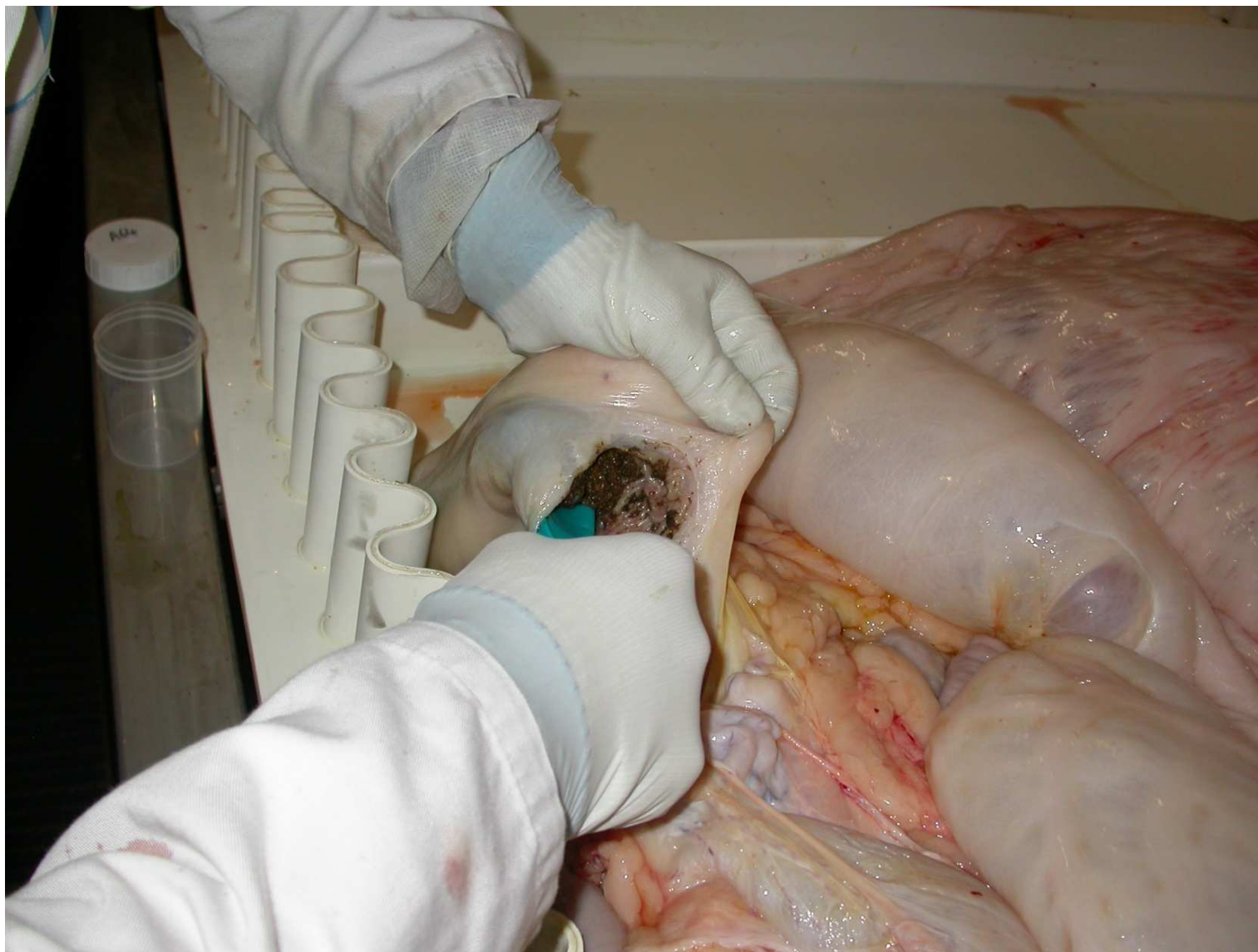


Réalisation pratique des prélèvements



- Personnel : 3 agents de l'Institut de l'élevage (A1-A3)
- Répartition des tâches
 - A1 : Incision ampoule rectale et prélèvement
 - A2 : Présentation du matériel, des pots, vérification de la traçabilité et détection des anomalies éventuelles
 - A3 : Relevée des données (Code Echantillon / n°tuerie) sur papier







Traçabilité des échantillons

- Carcasse : N° Tuerie (chronologique)
- Animal : N° IPG (10 chiffres)
- Echantillon : Code Labo

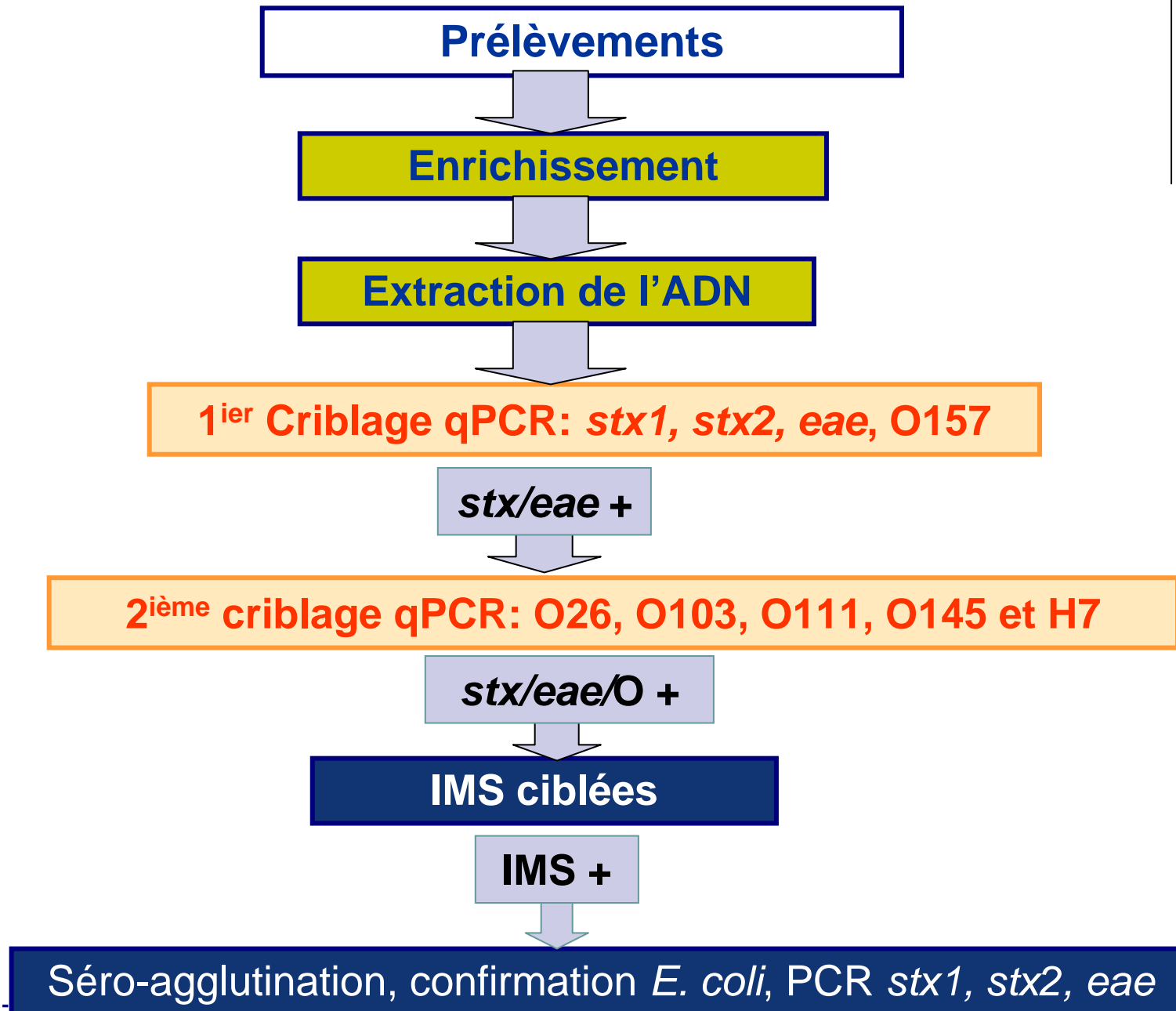
- Mise en correspondance Code Echantillon et N° de Tuerie
- Accès, en final, au N° IPG de l'animal



Éléments recueillis

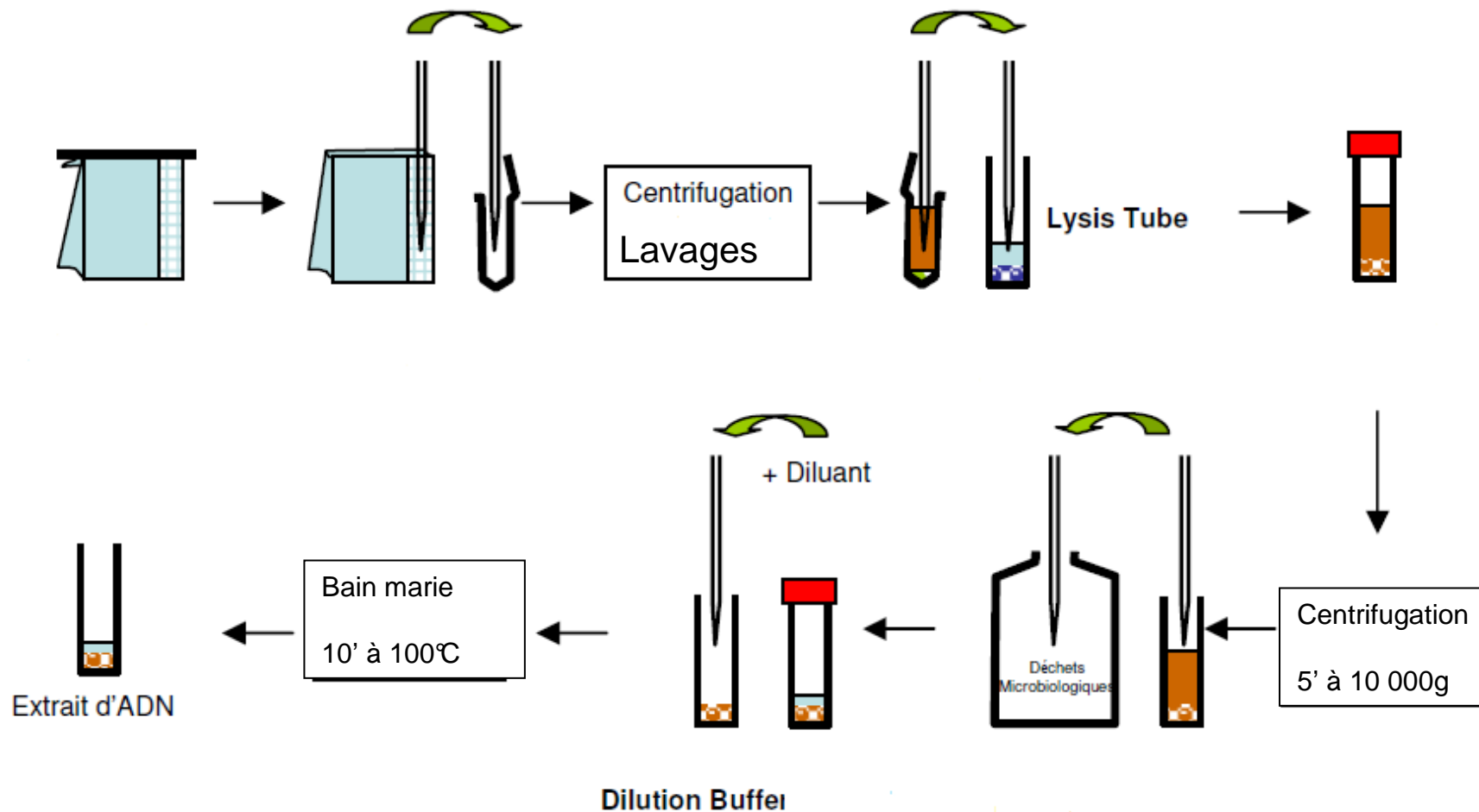
- L'ensemble des éléments qui caractérisent la carcasse, dont :
 - La catégorie
 - Le type racial
 - L'élevage de provenance

Campagne A : démarche expérimentale



Extraction de l'ADN

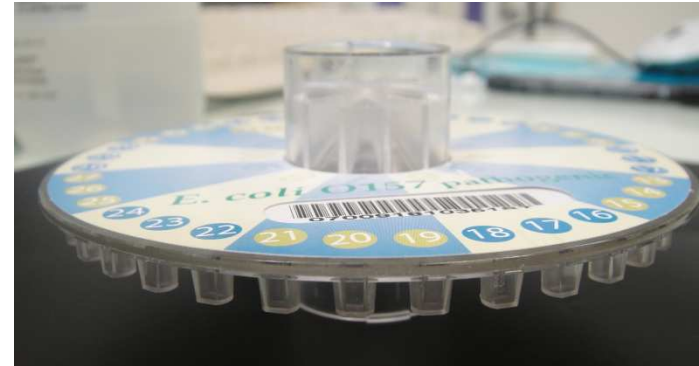
Kit Food extraction pack 01 (GeneSystems)



source illustration : GENESYSTEMS – PEFOOD01/100_Ecoli.FR

qPCR GeneDisc® Cyclor

1^{er} criblage qPCR: *stx1*, *stx2*, *eae*, O157



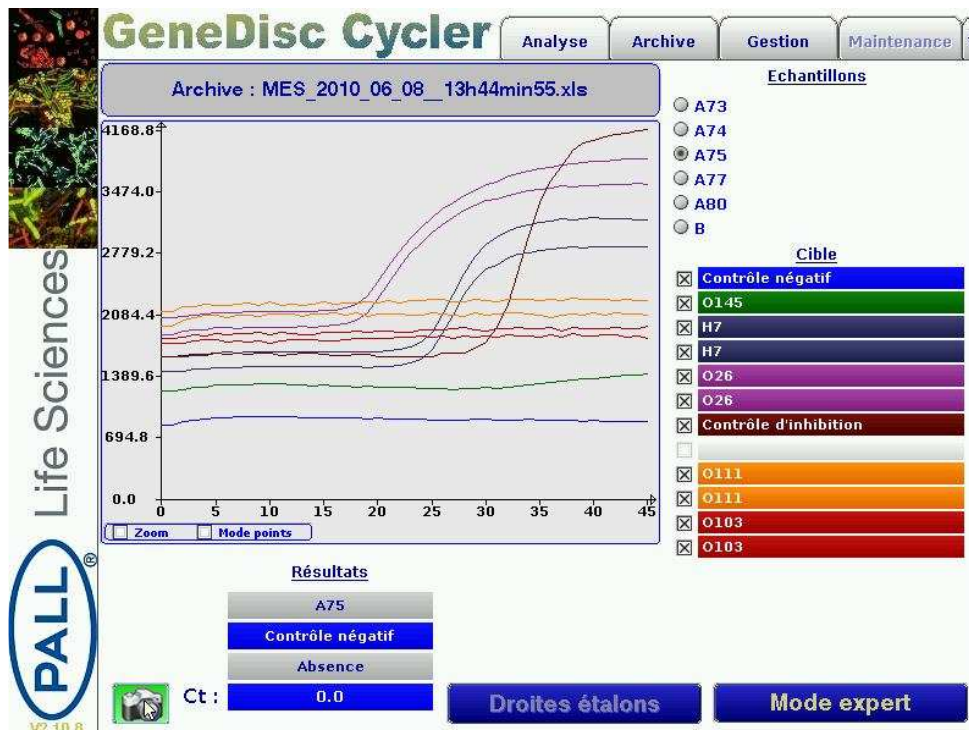
N° puits	Détection FAM	Détection ROX
1	Contrôle négatif de PCR	Contrôle d'inhibition
2	<i>stx2</i> (Perelle <i>et al.</i> , 2004)	<i>stx1</i> (Perelle <i>et al.</i> , 2004)
3	<i>rfbE</i> (O157) (Perelle <i>et al.</i> , 2004)	<i>eae</i> (Nielsen <i>et al.</i> , 2003)

qPCR GeneDisc® Cyclor

2^{ème} criblage qPCR: O26, O103, O111, O145 et H7



N° puits	Détection FAM	Détection ROX
1	Contrôle négatif de PCR	Contrôle d'inhibition
2	lhp1 (O145) (Perelle <i>et al.</i> , 2004)	
3	fliC (H7) (Perelle <i>et al.</i> , 2004)	wbdI (O111) (Perelle <i>et al.</i> , 2004)
4	fliC (H7)	wbdI (O111)
5	wzx (O26) (Perelle <i>et al.</i> , 2004)	wzx (O103) (Perelle <i>et al.</i> , 2005)
6	wzx (O26)	wzx (O103)



Population bovine prélevée

	Jeune Bovin	Vache	Taureau	
Viande	36	14	3	53
Laitier	32	59	2	93
Mixte	2	1	1	4
	70	74	6	150

Nbre ax abattus / élevage	Nbre élevage	
1	32	V
2	16	V
3	6	JB
4	2	V
5	2	JB
6	3	JB
7	1	JBV
11	1	JBL
14	1	VL
	64	

C.A : résultats 1^{er} criblage

Nbre et % de prélèvements positifs au 1er criblage

	Nbre	%
<i>stx</i>	133	88.7
<i>stx1</i>	80	53.3
<i>stx2</i>	109	72.7
<i>stx1 + stx2</i>	56	37.3
<i>eae</i>	109	72.7
<i>stx + eae</i>	100	66.7
<i>stx1 + eae</i>	17	11.3
<i>stx2 + eae</i>	37	24.7
<i>stx1 + stx2 + eae</i>	46	30.7
O157	23	
O157 + eae + stx	16	10.7
O157 + <i>stx1</i> + eae	2	
O157 + <i>stx2</i> + eae	5	
O157 + <i>stx1 + stx2</i> + eae	8	
O157 + <i>stx1 + stx2</i>	1	
O157 + <i>stx1</i>	3	
O157 + eae	3	
O157	1	

C.A : résultats 2^{ème} criblage

Nbre et % de prélèvements positifs au 2^{ème} criblage

	Nbre	%
O145 + eae + stx	77	77
<i>stx1 + eae</i>	14	
<i>stx2 + eae</i>	27	
<i>stx1+stx2+eae</i>	36	
O26 + eae + stx	23	23
<i>stx1 + eae</i>	3	
<i>stx2 + eae</i>	11	
<i>stx1+stx2+eae</i>	9	
O111 + eae + stx	2	2
<i>stx1+stx2+eae</i>	2	
O103 + eae + stx	25	25
<i>stx1 + eae</i>	5	
<i>stx2 + eae</i>	7	
<i>stx1+stx2+eae</i>	13	

Nbre de prélèvements *stx/eae/O+* = 87 sur 150 (58%)

Nbre IMS à réaliser = 143

Conséquences des résultats des criblages

- Criblages qPCR longs
- Beaucoup plus d'échantillons *stx/eae+* que prévu nécessitant l'étape du 2^{ème} criblage

- 143 IMS (dont 77 ciblées O145 !) : irréalisable
(150 IMS avaient été prévues pour l'ensemble de l'étude)

- Envoi des ADN extraits des fèces à l'ANSES de Maisons Alfort : réalisation de trois criblages successifs :
 - *stx1*, *stx2* et contrôle interne d'inhibition
 - les 5 sérogroupes
 - variants du gène *eae*

- Choix de 96 IMS à réaliser :
 - O157, O26, O103, O111 : *stx/eae/O+*
 - O145 : *stx/variant du gène associé à O/O+*

Résultats IMS, confirmation pEHEC, AEEC

	Nbre total IMS réalisées	Nbre IMS positives	Confirmation séro-groupe par qPCR (ANSES)
O157	19	8	8
O26	26	19	15
O103	28	21	1
O145	21	3	2
O111	2	1	0
Total	96	53	26

O157	8	6	O157:H7 eae γ1
		2	O157:H7 eae γ1 stx2
O26	15	1	O26 eae
		11	O26:H11 eaeβ1
		3	O26:H11 eaeβ1 stx1
O103	1	1	O103:H2 eae ϵ
O145	2	2 (+1)	O145:H28 eae γ1 stx2

Souches pEHEC

Bovin	Catégorie	Souches pEHEC
A58	JBV	O26:H11 <i>eaeβ1 stx1</i>
A77	JBV	O26:H11 <i>eaeβ1 stx1</i>
A126	JBM	O26:H11 <i>eaeβ1 stx1</i>
A113	VL	O145:H28 <i>eae γ1 stx2</i>
A119	JBL	O145:H28 <i>eae γ1 stx2</i>
A138	JBV	O145:H28 <i>eae γ1 stx2</i>
A86	JBL	O157:H7 <i>eae γ1 stx2</i>
A140	JBV	O157:H7 <i>eae stx2</i>

souches hautement pathogènes chez 8 bovins

8/150 = 5,3% des bovins

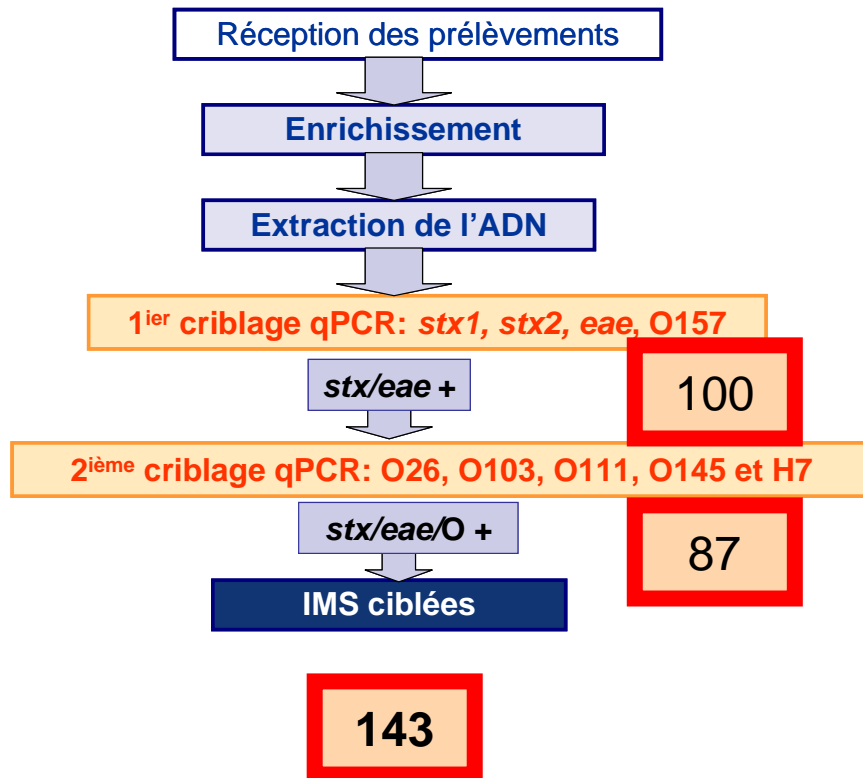
7/70 = 10% des JB

4/36 = 11.1% des JBV, 2/32 = 6.3% des JBL, 1/2 des JBM

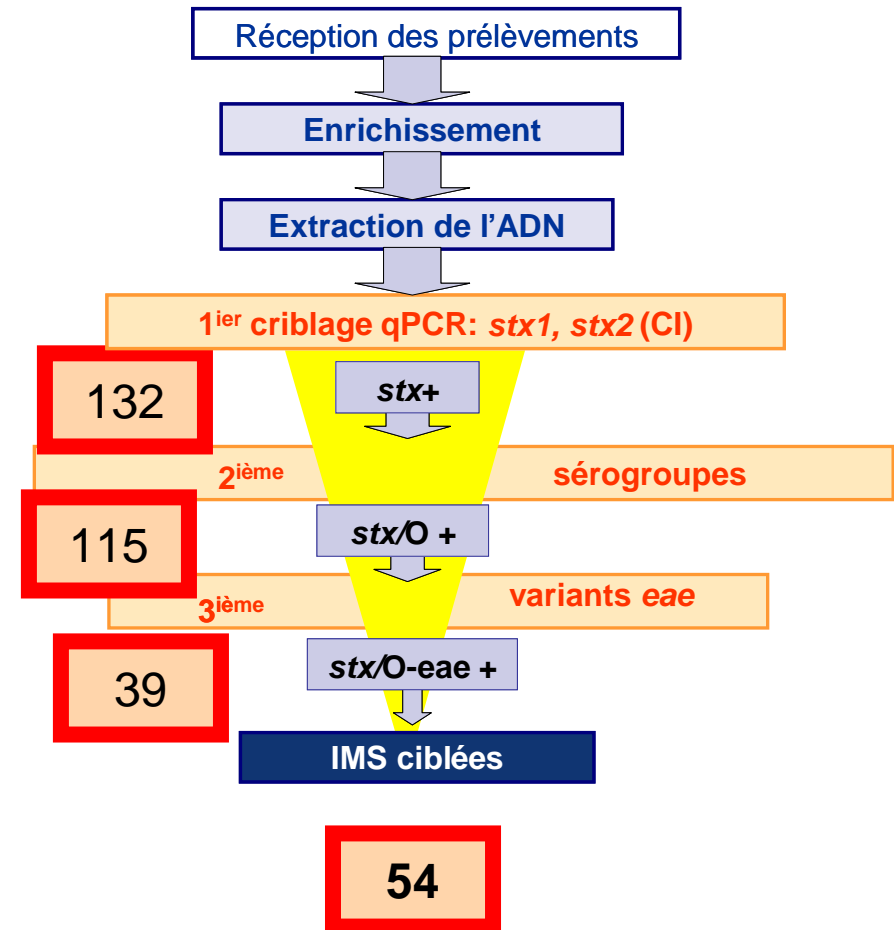
1/74 = 1,4% des Vaches

Comparaison démarches expérimentales

2 criblages



3 criblages



Comparaison démarches expérimentales

92% des souches appartenant aux 5 sérotypes recherchés ont été isolées à partir d'échantillons positifs pour le variant du gène *eae* correspondant

▶ Utilité du criblage sur le variant du gène *eae*

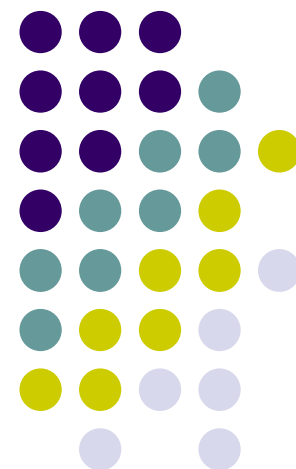
Bilan Campagne A

- Contraintes budgétaires
15% du budget (prévu 6%)
- Contraintes organisationnelles
- Contraintes techniques

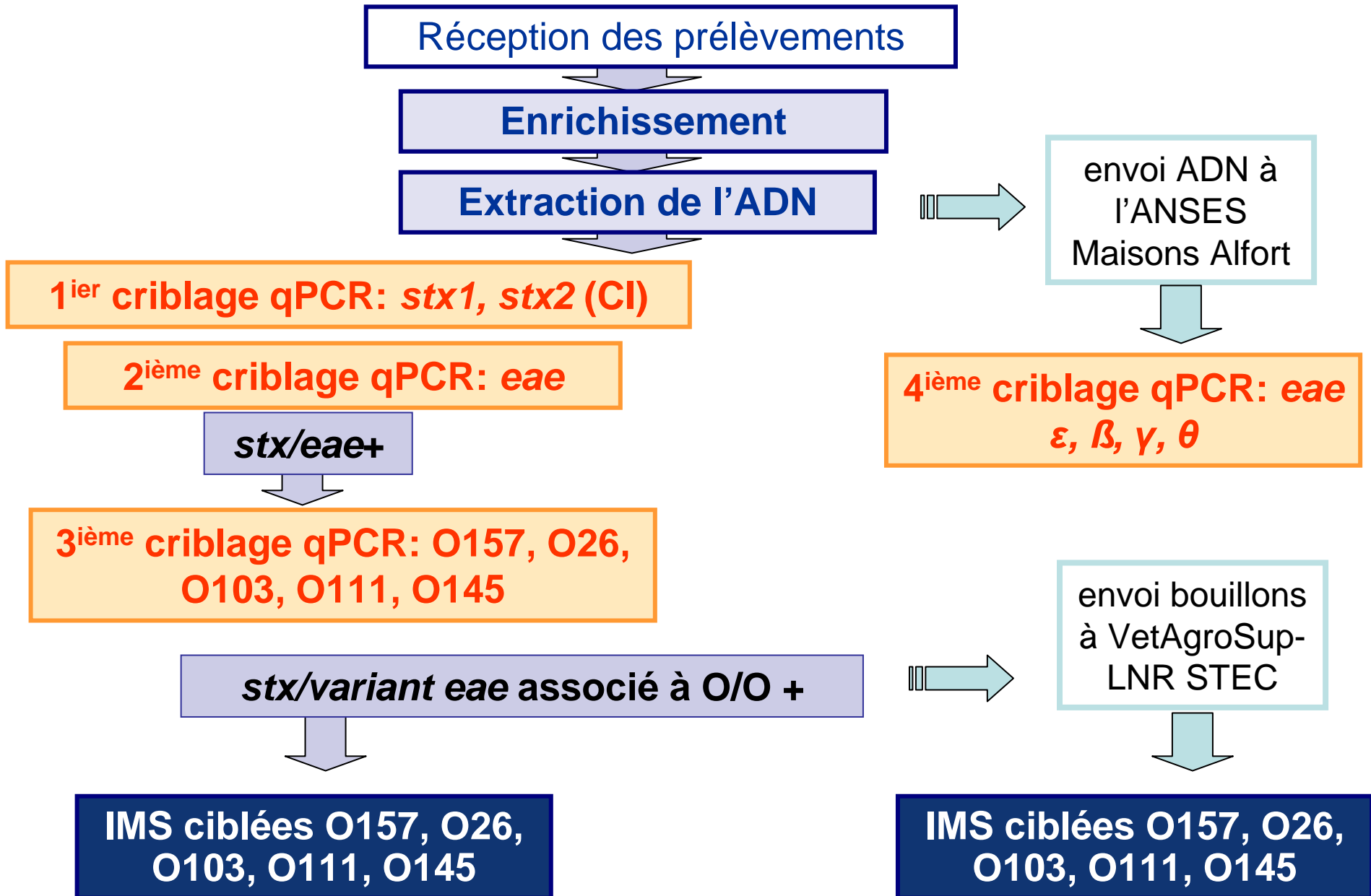
► Adaptations, réajustements nécessaires à apporter au protocole

- Nombre d'animaux
→ objectif : 400 animaux par catégorie : JB, VL, VV
- Démarche expérimentale
→ ajout du criblage variant gène *eae*
- Technologie qPCR
→ utilisation appareil qPCR 'ouvert'

Résultats campagnes B à H



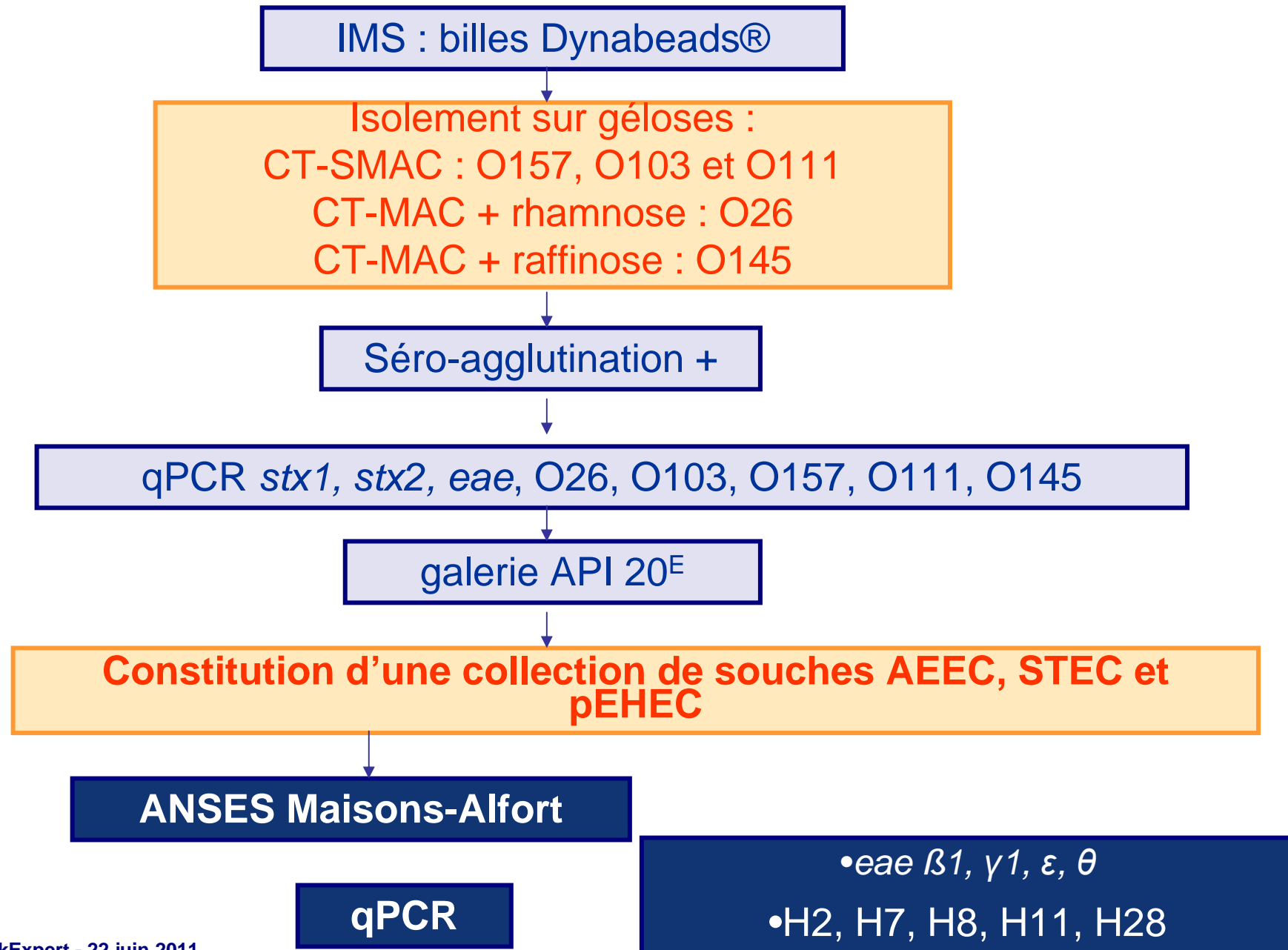
Criblages qPCR



qPCR : amorces et références

			Séquence 5'-3'	amplicon size (bp)	Reference
stx /CI	Primer	Forward	TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG		
		Reverse	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC		
stx1				131	Perelle et al, 2004
stx2				128	Perelle et al, 2004
CI				96	
stx1	Probe		FAM-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA-BHQ1		
stx2	Probe		TEXAS RED-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC-BHQ2		
CI	Probe		Cy5.5-CAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCG-BHQ3		Auvray et al, 2009
iae	Primer	Forward	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA	102	Nielsen et al, 2003
		Reverse	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA		
	Probe		FAM-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC-BHQ1		
In the sequence Y is (C, T), S is (C, G), W is (A, T), R is (A, G), M is (A, C).					
rfbE(O157)	Primer	Forward	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA	88	Perelle et al, 2004
		Reverse	CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT		
	Probe		FAM-AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATT AAGG-BHQ1		
wbdI(O111)	Primer	Forward	CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT	146	Perelle et al, 2004
		Reverse	TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC		
	Probe		FAM-TTGAATCTCCAGATGATCAACATCGTGAA-BHQ1		
wzx(O26)	Primer	Forward	CGCGACGGCAGAGAAAATT	135	Perelle et al, 2004
		Reverse	AGCAGGCTTTATATTCTCCAACCTT		
	Probe		TEXAS RED-CCCGTTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA-BHQ2		
ihp1(O145)	Primer	Forward	CGATAATATTTACCCACCAGTACAG	132	Perelle et al, 2004
		Reverse	GCCGCCGCAATGCTT		
	Probe		Cy5.5-CCGCCATT CAGAATGCACACAATATCG-BHQ3		
wzx (O103)	Primer	Forward	CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT	99	Perelle et al, 2005
		Reverse	GAAAAAAGCACCCCGTACTTAT		
	Probe		FAM-CATAGCCTGTTGTTTAT-BHQ1		

IMS et confirmations ENVT/ANSES/LNR STEC



Travaux réalisés à l'ANSES - LSA

➤ Démarche expérimentale :

ADN extrait de fèces (ENVT)



**Détection
par PCR en
temps réel
multiplex**

eae- β **eae- ε** **eae- θ** **eae- γ**

Madic et al. JAM 2010. 109:1696-1705.

LightCycler 480



ADN souches isolées (ENVT)



**Détection
par PCR en
temps réel
multiplex**

O26	O103	O111	O145	O157
H11	H2	H8	H28	H7
eae-β	eae-ε	eae-θ	eae-γ	

Autres facteurs (*tccP*, OI-122, etc...)

Madic et al. JAM 2010. 109:1696-1705.

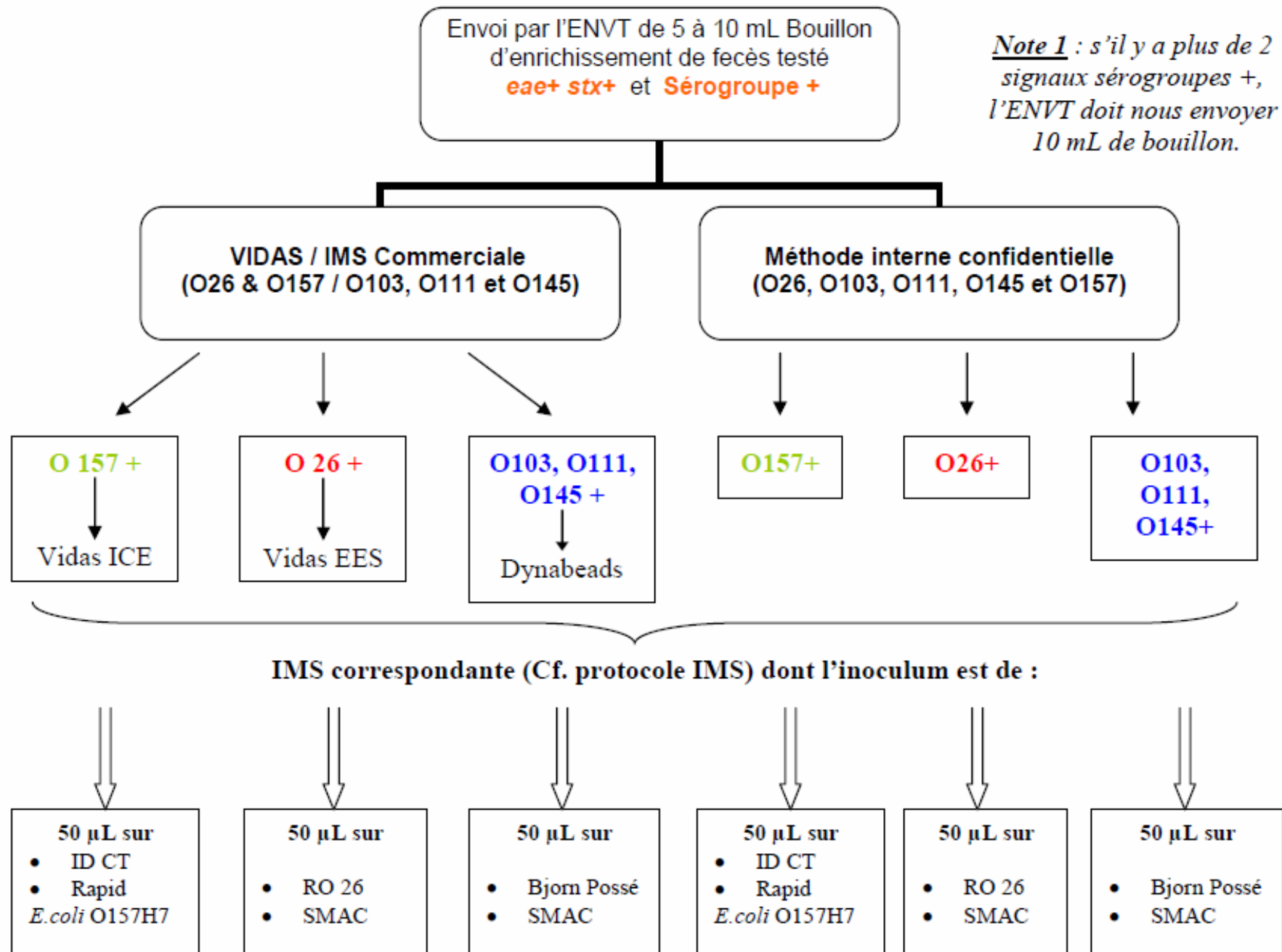
Madic et al. LAM 2011. sous presse.

Travaux réalisés au LNR-STECC

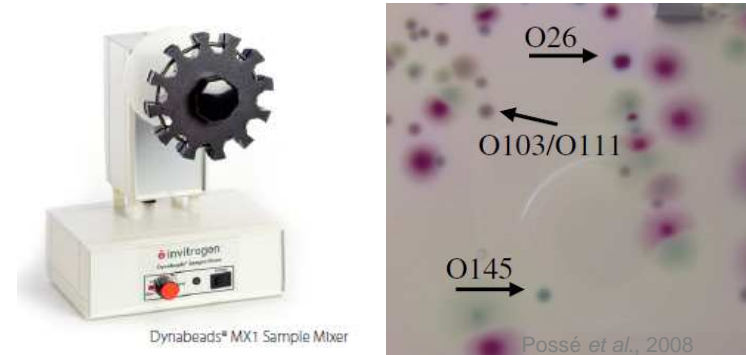
- **Confirmer** les résultats de suspicion de présence de STEC hautement pathogènes dans les fèces étudiés en isolant les souches STEC
- **Caractériser** génétiquement les souches isolées



Travaux réalisés au LNR-STECC



Démarche séquentielle



1) Recherche des colonies suspectes

- Crible de 25 colonies/sérogroupe recherché/ méthode (soit 50 colonies/sérogroupe)
- Recherche des marqueurs somatiques (RT-PCR)
- Si marqueur somatique +, recherche des principaux facteurs de virulence des STEC (*eae*, *stx*₁, *stx*₂) (RT-PCR)

2) Caractérisation des colonies isolées (Si un des gènes +)

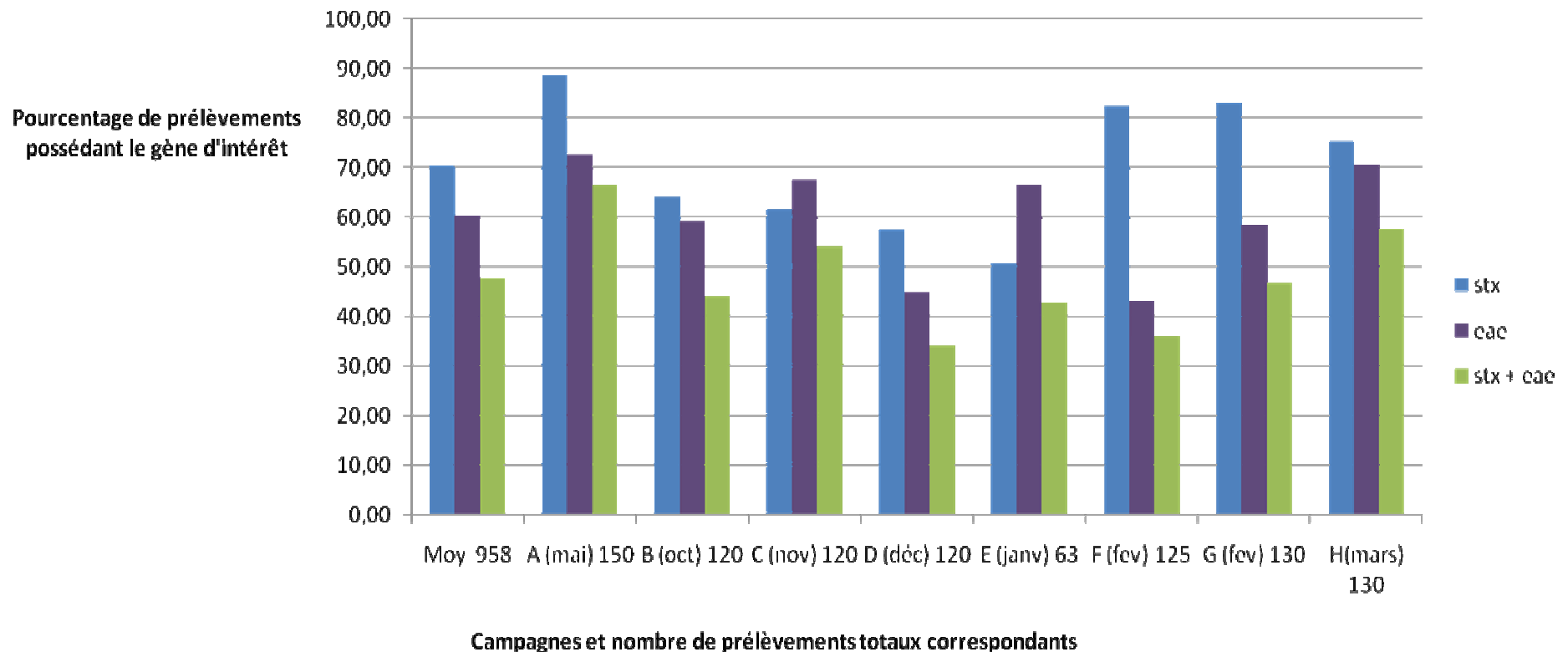
- Identification biochimique
- Détermination du sérotype (RT-PCR)
- Recherche d'autres facteurs de virulence (variants *eae*, *hlyA*, O1122) (PCR et RT-PCR)

Population bovine prélevée

Campagne	Date	Nbre	Catégories d'animaux			
			JB = Jeune Bovin		V = Vache de réforme	
			JBL	JBV	VL	VV
A	25/05/2010	150	32	38	61	19
B	19/10/2010	120	0	5	3	112
C	16/11/2010	120	8	0	88	24
D	07/12/2010	120	1	21	32	66
E	11/01/2011	63	7	52	1	3
F	01/02/2011	125	19	64	9	33
G	22/02/2011	130	24	47	46	13
H	22/03/2011	130	28	70	6	26
I	12/04/2011	130	57	18	28	27
Total		1088	176	315	274	323

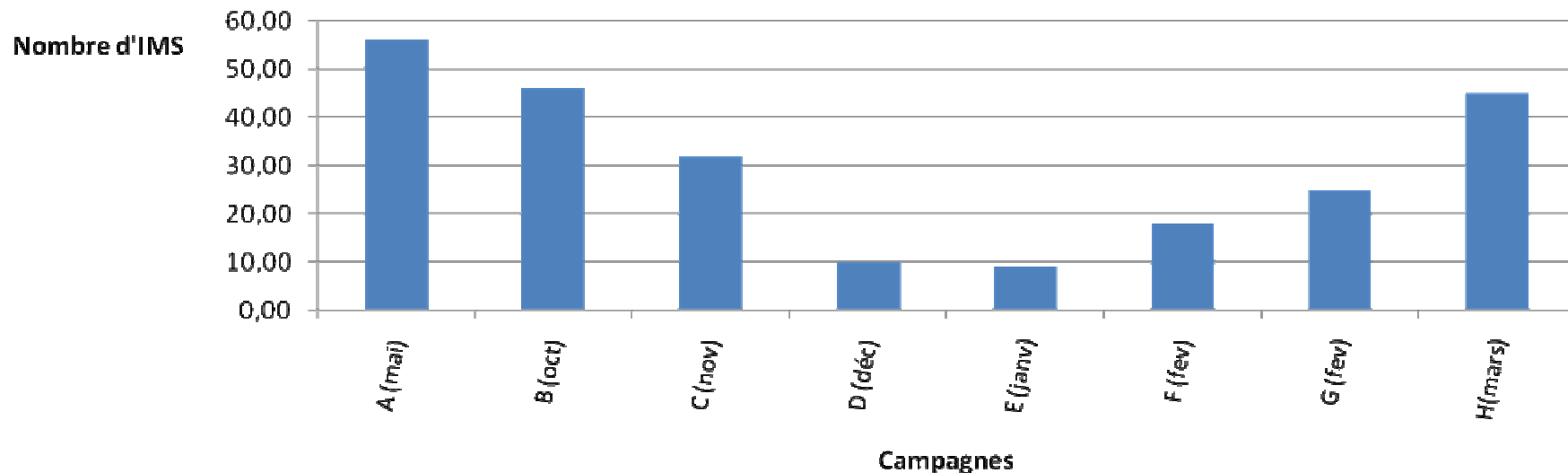
Criblages *stx* et *eae*

Pourcentage de prélèvements possédant le gène d'intérêt en fonction des campagnes

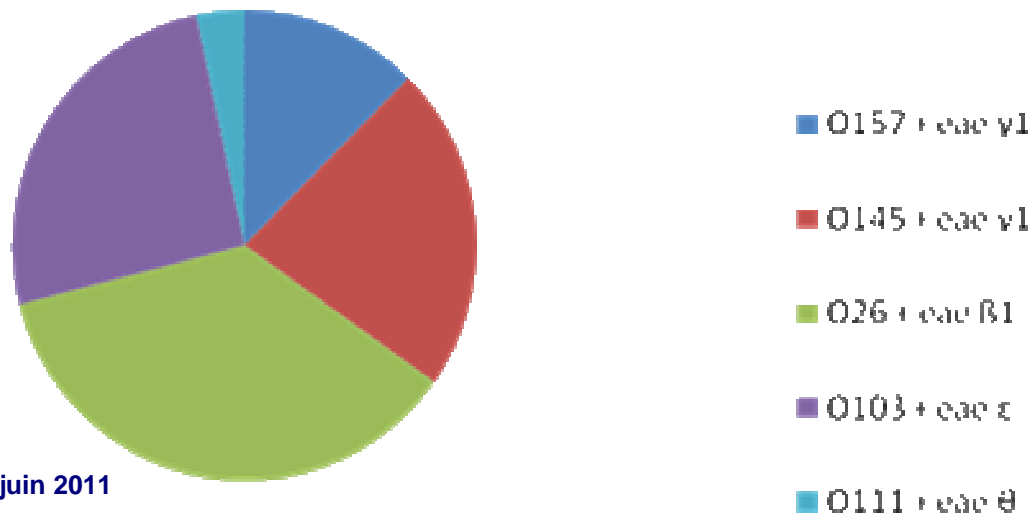


Criblages *stx* + variants *eae* + sérotype

Nombre d'IMS à réaliser pour chaque campagne



Représentation du nombre d'IMS total à effectuer en fonction du sérotype

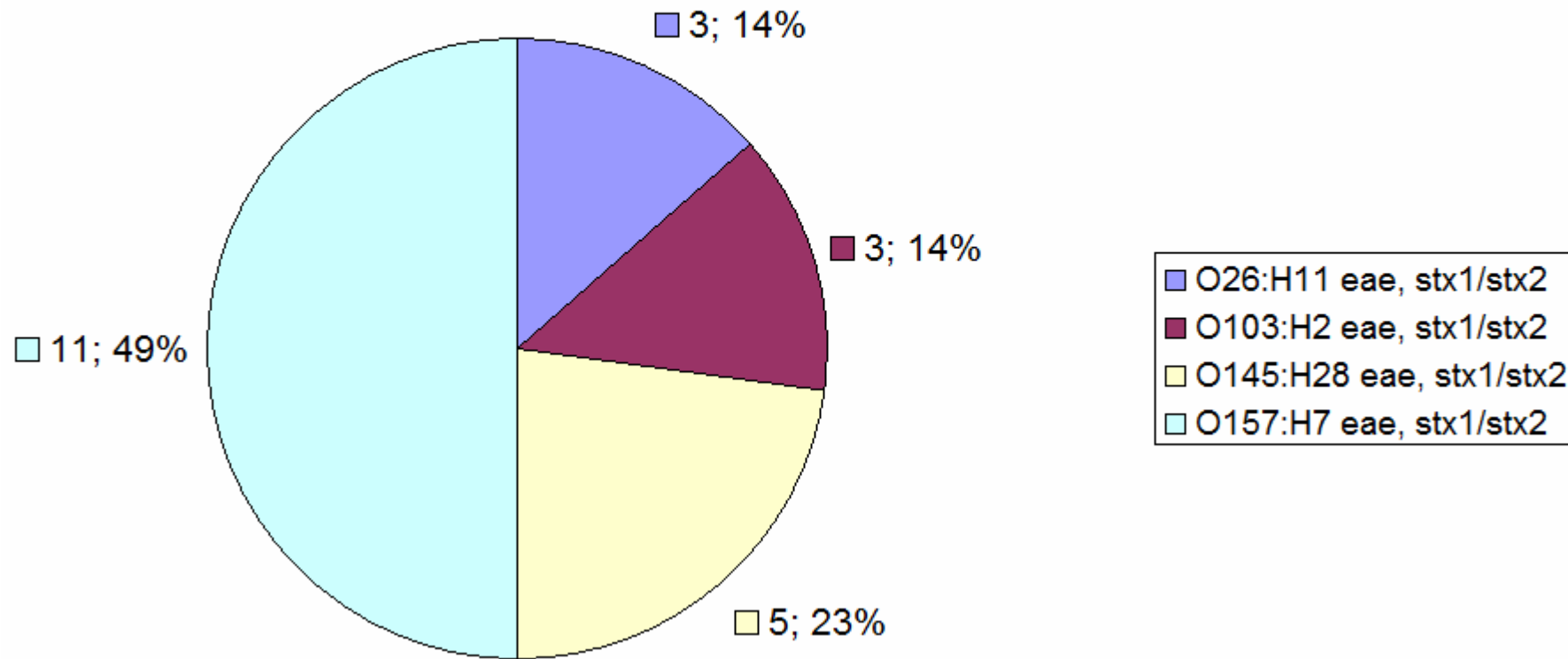


196 IMS réalisées
129 IMS « positives »

Souches d'intérêt isolées
à partir de **54**
prélèvements

Souches pEHEC (ENVT + VetAgroSup)

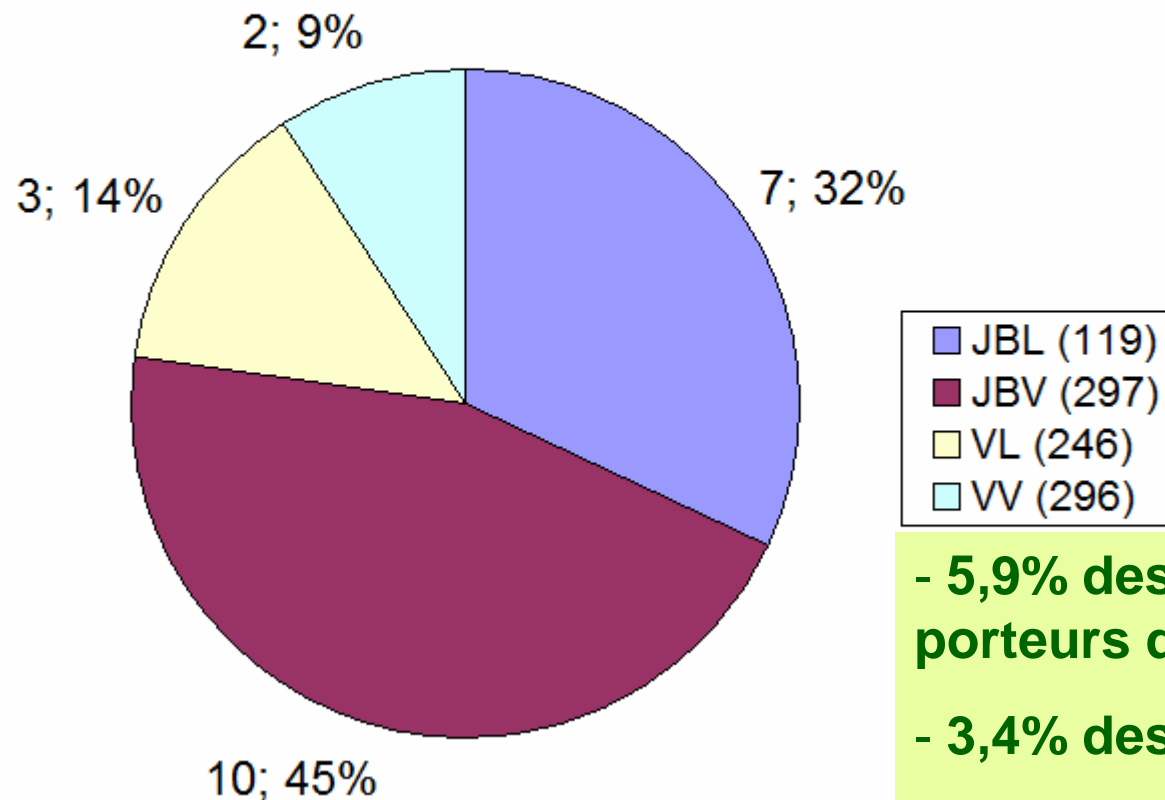
22 animaux (sur 958) porteurs de souches pEHEC (A à H)



2,3% des animaux prélevés sont porteurs d'une souche pEHEC

Souches pEHEC (ENVT + VetAgroSup)

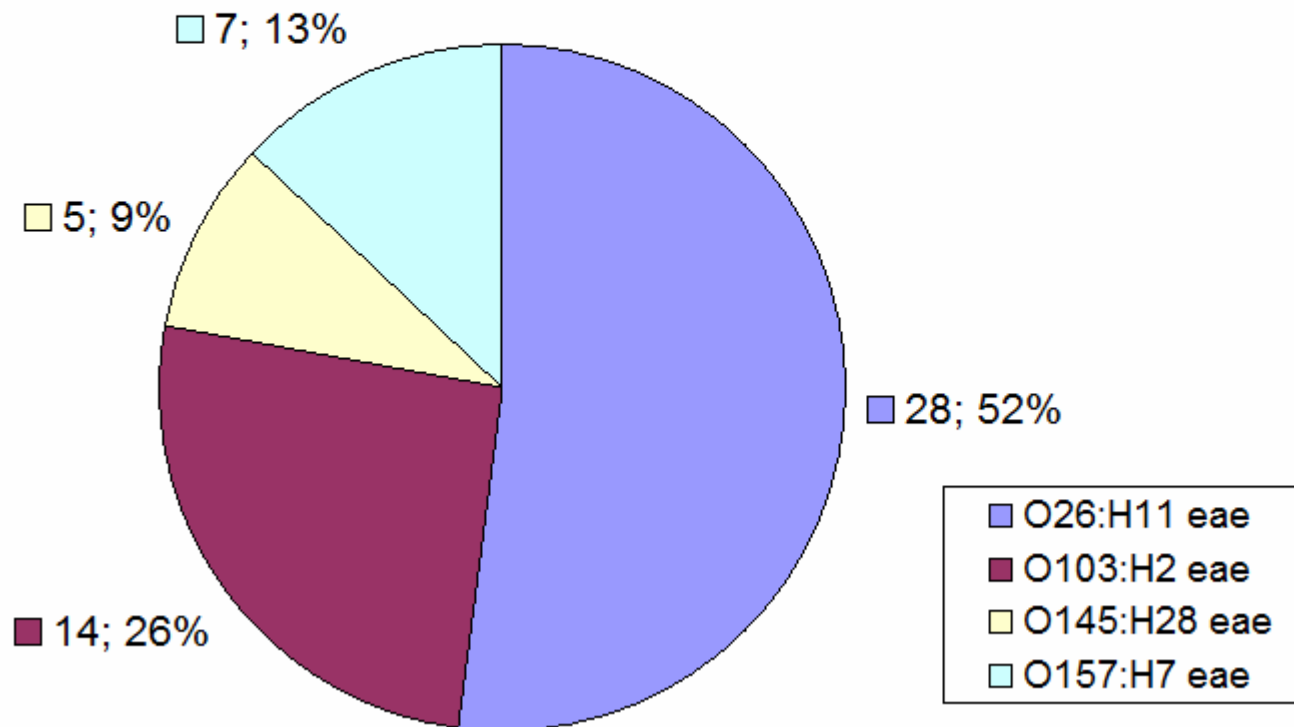
Nombre de souches pEHEC isolées pour chaque catégorie de bovins prélevés



- 5,9% des JBL prélevés sont porteurs d'une souche pEHEC
- 3,4% des JBV
- 1,2% des VL
- 0,7% des VV

Souches AEEC (ENVT + VetAgroSup)

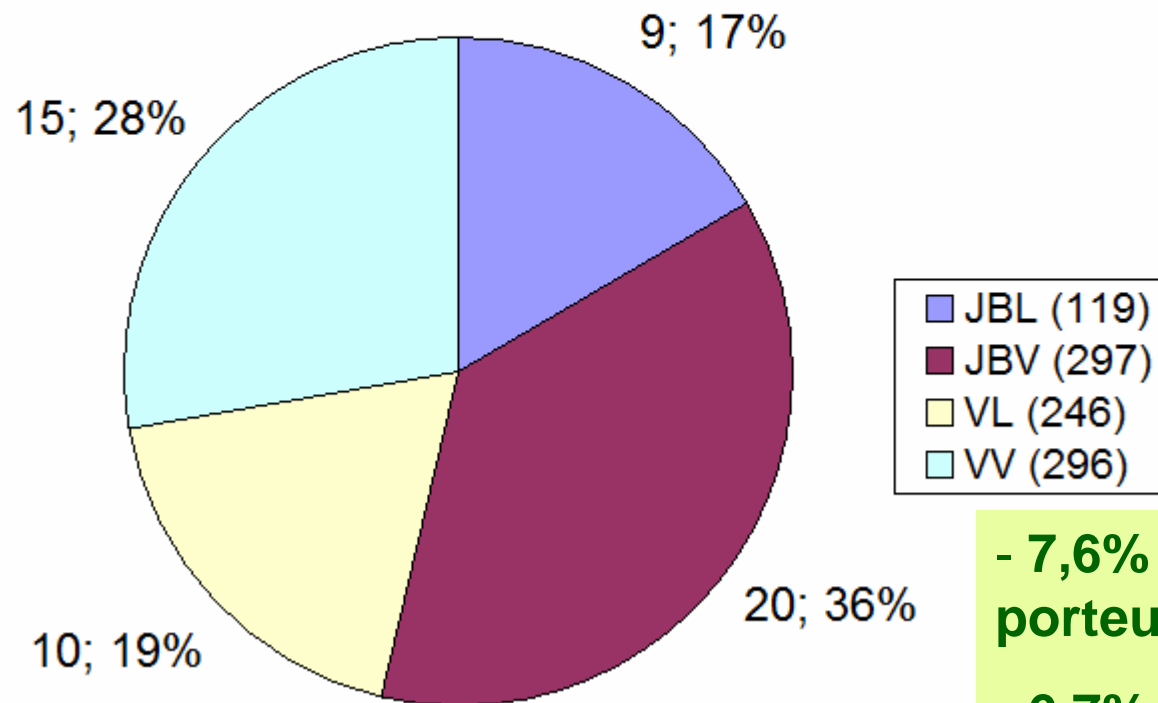
54 animaux (sur 958) porteurs de souches AEEC
d'un des 5 sérotypes d'EHEC typiques majeurs (A à H)



5,6% des animaux prélevés sont porteurs d'une souche AEEC avec un des sérotypes d'EHEC typique majeur

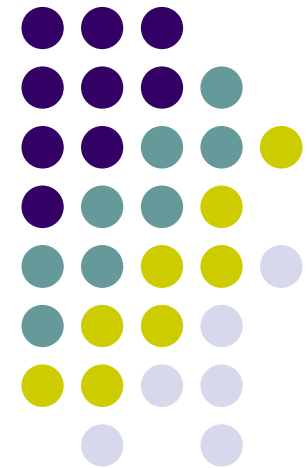
Souches AEEC (ENVT + VetAgroSup)

Nombre de souches AEEC isolées
pour chaque catégorie de bovins prélevés



- 7,6% des JBL prélevés sont porteurs d'une souche AEEC
- 6,7% des JBV
- 4,1% des VL
- 5,1% des VV

Conclusions



Bilan organisationnel



- Analyse poussée de la campagne A qui a permis de réajuster le protocole
- Campagnes B à K réalisées et analysées (ou en cours)
- Il reste 1 campagne: L, le 28/06/2011

Bilan pEHEC intermédiaire A à H



- Prévalence : 2,3%
 - EHEC O157 > O145 > O26, O103
 - 0 EHEC O111
- ++ campagne A (mai)
- > chez JB : JBL > JBV

Bilan AEEC intermédiaire A à H



- Prévalence : 5,6%
 - AEEC O26 > O103 > O157 > O145
 - 0 AEEC O111
- > lors campagne A (mai 2010)
- > chez JB
- AEEC O145 seulement chez V
- AEEC O157 seulement chez JB

Merci de votre attention

