



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Maisons-Alfort, le 1<sup>er</sup> décembre 2008

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif aux méthodes disponibles pour détecter les *Escherichia coli*  
producteurs de shigatoxines, considérées comme pathogènes pour  
l'homme selon l'avis de l'Afssa du 15 juillet 2008.**

### Rappel de la saisine :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 avril 2008 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) d'une demande d'avis relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (STEC) considérées comme pathogènes pour l'homme.

L'Agence a rendu un premier avis concernant la définition des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme et l'avis de l'AFSSA correspondant a été rendu le 15 juillet 2008. L'Agence était également sollicitée par la DGAL pour identifier « *les sérogroupes devant faire l'objet d'une surveillance particulière par les opérateurs, pour les denrées alimentaires identifiées comme facteurs de risques au regard de l'apparition d'infections chez l'homme* », ainsi que les méthodes disponibles permettant leur détection.

### Contexte :

Le contexte épidémiologique et réglementaire de cet avis demeure identique à celui décrit dans l'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008. Les points suivants peuvent être rappelés :

- Les professionnels de l'industrie agroalimentaire ont une obligation de résultat, explicitement définie par l'article 14 du règlement (CE) No 178/2002, portant sur le caractère sûr et sain de la denrée alimentaire et sur la protection de la santé du consommateur.
- Ils ont l'obligation de mettre en place, sous leur responsabilité, un plan de maîtrise sanitaire comprenant, en particulier, une analyse des dangers et les mesures de maîtrise de ces dangers élaborées selon les principes HACCP.
- L'absence de définition de critères microbiologiques vis-à-vis des souches de STEC pathogènes, au sein du règlement (CE) No 2073/2005 modifié, ne signifie pas que la recherche de ces bactéries soit sans intérêt. La note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14 janvier 2008 rappelle le contexte et les principaux objectifs recherchés lors de la mise en œuvre des analyses microbiologiques, dans le cadre d'autocontrôles ou de contrôles officiels, et présente des lignes directrices destinées à expliquer comment ces analyses s'intègrent dans le plan de maîtrise sanitaire d'un établissement.

Ainsi, les professionnels et les gestionnaires du risque ont besoin d'orientations et de recommandations concernant les méthodes disponibles pour la recherche des dangers définis dans l'avis AFSSA du 15 juillet 2008.

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
94701

Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

**Méthode d'expertise :**

Une expertise initiale a été réalisée par une partie des membres d'un groupe de travail de l'AFSSA, ayant récemment mené une analyse quantitative des risques liés aux STEC<sup>1</sup>. Leur rapport initial a fait l'objet d'une expertise collective, réalisée par le Comité d'experts spécialisé « Microbiologie », le 13 novembre 2008, concernant les méthodes disponibles pour rechercher les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines considérés comme hautement pathogènes pour l'homme, comme définis dans l'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008.

**Argumentaire :**

L'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008 définit les « EHEC typiques majeurs », selon les critères génétiques suivants :

- EHEC O157:H7 = rfbEO157, flicH7, stx1 et/ou stx2, eae-gamma, (OI#122).
- EHEC O26:H11 = wzxO26, flicH11, stx1 et/ou stx2, eae-beta, (OI#122).
- EHEC O145:H28 = ihp1O145, flicH28, stx1 et/ou stx2, eae-gamma, (OI#122).
- EHEC O103:H2 = wzxO103, flicH2, stx1 et/ou stx2, eae-epsilon, (OI#122).
- EHEC O111:H8 = wbd1O111, flicH8, stx1 et/ou stx2, eae-theta, (OI#122).

Cette définition des « EHEC typiques majeurs » est amenée à évoluer si d'autres déterminants sont caractérisés. La pertinence et la nature des méthodes analytiques disponibles devront alors être ré-évaluées en fonction de la définition des EHEC typiques majeurs.

Voici les méthodes de détection disponibles au stade actuel des connaissances. L'avis donne également des recommandations quant à l'utilisation de ces méthodes dans le cadre des contrôles officiels, des plans de surveillance et des autocontrôles.

- **Bilan concernant les méthodes de détection disponibles.**

- **S'agissant des souches *E. coli* O157:H7 pathogènes :**

Il existe aujourd'hui une méthode de référence (NF EN ISO 16654) et plusieurs méthodes alternatives validées, ayant reçu la marque AFNOR Validation et qui de ce fait sont reconnues par la DGAL. Elles peuvent donc être mises en œuvre lors des plans de surveillance nationaux et peuvent l'être par les industriels dans le cadre des autocontrôles. De plus amples détails sur les méthodes disponibles sont présentés en annexe du présent avis.

- **S'agissant des souches STEC pathogènes non-O157 :**

Aucune méthode de référence ou méthode alternative validée n'est actuellement disponible pour détecter ces souches.

Cependant, une « Spécification Technique (TS) CEN-ISO » devrait très prochainement paraître, décrivant une méthode horizontale pour la détection des STEC pathogènes appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145. De plus amples informations, comprenant notamment des points d'amélioration concernant cette approche, sont développées en annexe du présent avis. Cette méthode d'analyse est capable de renseigner rapidement et simplement la présence, au sein de l'échantillon analysé, de multiples déterminants génétiques de virulence ou d'appartenance aux cinq sérotypes majeurs. Cependant, la mise en évidence de ces marqueurs ne conduit qu'à une conjecture

<sup>1</sup> Groupe de travail « AQR STEC » de l'AFSSA, ayant récemment mené une analyse quantitative des risques liés aux STEC dans les steaks hachés surgelés, consommés en restauration familiale en France, par les enfants de moins de 16 ans, et qui a fait l'objet d'un rapport de l'AFSSA (octobre 2007), actuellement en ligne ([Hwww.afssa.fr/H](http://www.afssa.fr/H)).

et seul l'isolement d'une souche de « EHEC typique majeure » permet d'affirmer la présence d'un danger avéré.

- **Recommandations relatives aux modalités de contrôle officiel.**

Dans le cadre des contrôles officiels, la présence de souches *E. coli*, définies uniquement sur la base de leur formulation antigénique comme appartenant au sérotype O157:H7, devraient entraîner la mise en oeuvre de mesures de gestion appropriées, particulièrement quand les résultats s'appliquent à des denrées alimentaires hautement périssables.

L'argumentaire de cette recommandation repose,

- d'une part, sur l'obtention d'une très faible proportion de faux positifs obtenus par les méthodes alternatives validées pour la recherche des souches *E. coli* O157:H7 et
- d'autre part, sur les données épidémiologiques collectées qui soulignent la proportion majoritaire, en France et en Europe des souches du sérotype O157:H7 parmi les souches EHEC typiques majeures.

Pour la réalisation des contrôles officiels, il est aujourd'hui prématuré d'évaluer la conformité des denrées alimentaires vis-à-vis d'une contamination éventuelle par des souches *E. coli* non-O157:H7 vu l'absence:

- de consensus au niveau européen pour définir ces souches comme pathogènes,
- de critère microbiologique réglementaire européen,
- de méthode reconnue au niveau international pour les détecter,
- de laboratoires agréés (quatre laboratoires sont actuellement agréés pour la recherche des gènes *stx* par PCR temps réel, confère la note de service DGAL/SDSSA/N2007-8321 du 24 décembre 2007),

- **Recommandations relatives aux modalités de surveillance**

Pour la mise en oeuvre des plans de surveillance, il est recommandé de rechercher l'ensemble des souches appartenant aux cinq sérotypes majoritairement impliqués dans la survenue de SHU. La caractérisation des déterminants génétiques de virulence (*stx* et *eae*) est également importante afin de suivre l'évolution éventuelle de la répartition de ces souches pathogènes.

- **Recommandations relatives aux modalités d'autocontrôle**

Dans le cadre de la mise en oeuvre des autocontrôles, il semble essentiel de mettre l'accent sur le sérotype O157:H7. Dans le cas d'une détection de souches *E. coli*, définies uniquement sur la base de leur formulation antigénique comme appartenant au sérotype O157:H7, les opérateurs devraient prendre les mesures appropriées, sans attendre la confirmation par isolement.

Par ailleurs, afin d'accumuler des données de prévalence, la recherche des quatre autres sérogroupes pourrait faire l'objet d'une démarche volontaire des opérateurs. La mise en oeuvre de tests commercialisés, lorsqu'ils seront certifiés conformément à un référentiel reconnu au niveau international (confère l'article 5 du règlement (CE) n°2073/2005), permettant l'obtention de résultats rapides (en quelques heures) sur le site de production, est à encourager afin d'améliorer la maîtrise des dangers. Ces nouvelles méthodes peuvent être considérées comme des outils complémentaires des bonnes pratiques d'hygiène et d'un plan de maîtrise sanitaire validé pour garantir la sécurité des produits. Il est important de rappeler ici que les mesures correctives prises en cas de résultats d'autocontrôles positifs, demeurent de la responsabilité des professionnels.

- **Éléments complémentaires relatifs à l'échantillonnage**

En complément des éléments présentés ci-dessus en réponse aux questions de la saisine, les recommandations relatives à l'échantillonnage, présentées dans les documents « Afssa » cités ci-après, peuvent être considérées dans le cadre de la maîtrise des procédés et de la détection d'une contamination rare et de faible niveau par les STEC pathogènes.

Le rapport intitulé « *Appréciation quantitative des risques liés à Escherichia coli O157:H7 dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale en France par les enfants de moins de 16 ans* » (octobre 2007) et la note du 7 novembre 2006 présentée en fin de ce rapport, apportent des éléments relatifs à l'estimation du niveau de contamination des steaks hachés industriels en France.

Par ailleurs, une réflexion concernant la contamination microbienne des préparations lactées en poudre destinées au nourrissons ou aux personnes âgées, a été menée à l'Agence et a abouti à un rapport disponible sur le site [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr). Sans préjuger du caractère extrapolable à la problématique liée aux STEC pathogènes, la démarche de modélisation de la contamination proposée dans ce rapport est intéressante à prendre en compte car il s'agit, dans les deux cas, d'une contamination de faible niveau et de faible occurrence. Parmi les recommandations finales, le rapport mentionne :

- qu'il est préférable d'opérer par échantillonnage systématique et d'utiliser le suivi des résultats obtenus sur une longue période pour caractériser le statut hygiénique des lignes de fabrication, en utilisant des méthodes statistiques appropriées ;
- que l'analyse microbiologique des lots par échantillonnage ne garantit pas à elle seule l'innocuité des produits mis sur le marché.

Plus généralement, quelle que soit la filière de production et le procédé utilisé, le plan d'échantillonnage doit être mis en place en fonction d'objectifs de sécurité sanitaire (ou FSO, Food Safety Objectives), fixés par le gestionnaire.

### **Conclusions :**

Dans l'immédiat, les méthodes normalisées et validées permettant la détection des souches du sérotype O157:H7 sont les plus appropriées pour la détection des souches « EHEC typiques majeures », même si ces méthodes ne ciblent que partiellement les dangers définis dans l'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008.

L'Afssa a identifié une approche analytique applicable pour la recherche de l'ensemble des souches « EHEC typiques majeures ». Cette approche fera très vraisemblablement l'objet d'une future spécification technique au Comité européen de normalisation (CEN). Toutefois, cette approche n'a pas fait à ce jour l'objet d'une validation par le groupe AFNOR ou un organisme étranger équivalent.

A ce stade, l'Agence juge essentiel de souligner que la détection des différents marqueurs génétiques dans un même échantillon ne conduit qu'à une conjecture. Seul l'isolement d'une souche de « EHEC typique majeure » permet d'affirmer la présence d'un danger avéré. En outre, il convient de tenir compte de l'absence de recul sur une méthode qui n'est pas encore optimisée, et de fait délicate à mettre en oeuvre en milieu industriel.

L'Afssa encourage les fournisseurs de kits de détection des souches « EHEC typiques majeures » à mener les travaux nécessaires pour valider les nouvelles méthodes.

Par ailleurs, l'Afssa émet les recommandations suivantes à destination du gestionnaire du risque, afin d'orienter les professionnels des filières concernées :

- Préconiser la mise en oeuvre de la méthode normalisée (NF EN ISO 16654) ou des méthodes validées permettant la détection des souches E. coli O157:H7 dans le cadre des contrôles officiels, des plans de surveillance et des autocontrôles.

- Encourager la validation des nouvelles méthodes proposées pour la détection des STEC pathogènes non-O157.
- Encourager les professionnels à communiquer aux gestionnaires et évaluateurs du risque les difficultés qu'ils rencontrent dans la mise en œuvre des méthodes et/ou l'interprétation des résultats obtenus.
- Rédiger une circulaire pour la mise en oeuvre de l'échantillonnage (notion de lots, retraits associés) par les opérateurs des filières devant prendre en compte le danger « STEC O157:H7 ». L'Agence pourra être sollicitée pour apporter, si nécessaire, un appui scientifique et technique.

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de l'alimentation (DGAI) du 25 avril 2008, concernant une demande d'avis relatif aux méthodes disponibles pour détecter les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, considérées comme pathogènes pour l'homme selon l'avis de l'Afssa du 15 juillet 2008.

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments

Pascale BRIAND

**Mots clés :** *Escherichia coli*, virulence, pathogène, détection, méthode.

**Principales références bibliographiques :**

- Anonyme (2007). "Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types." *The EFSA Journal* **5**(9): 1-61.
- Auvray, F. *et al.* (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**(6): 646-51.
- Fricker, M. *et al.* (2007). "Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks." *Appl Environ Microbiol* **73**(6): 1892-8.
- Karmali, M. A. *et al.* (2003). "Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease." *J Clin Microbiol* **41**(11): 4930-40.
- Nielsen, E. M. and M. T. Andersen (2003). "Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay." *J Clin Microbiol* **41**(7): 2884-93.
- Perelle, S. *et al.* (2004). "Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases." *Mol Cell Probes* **18**(3): 185-92.
- Perelle, S. *et al.* (2005). "Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction." *J Appl Microbiol* **98**(5): 1162-8.
- Perelle, S. *et al.* (2007). "Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157." *Int J Food Microbiol* **113**(3): 284-8.
- Posse, B. *et al.* (2008a). "Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157." *FEMS Microbiol Lett* **282**(1): 124-31.
- Posse, B. *et al.* (2008b). "Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol." *J Appl Microbiol*.

**Annexe de l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments**  
relatif aux méthodes disponibles pour détecter les *Escherichia coli*  
producteurs de shigatoxines, considérées comme pathogènes pour l'homme  
selon l'avis de l'Afssa du 15 juillet 2008.

**A) Précisions relatives aux méthodes de détection de *E. coli* O157:H7**

La méthode de référence NF EN ISO 16654, pour la détection de *E. coli* O157:H7 dans les denrées alimentaires, est fondée sur l'immuno-séparation magnétique après 6h ou 18-24h d'enrichissement.

Il existe à ce jour, deux méthodes alternatives ayant reçu la marque AFNOR validation:

- La méthode VIDAS qui permet la détection immuno-enzymatique de l'antigène somatique O157 et en cas de résultats positifs, une immuno-concentration est faite par l'automate suivie de l'isolement de l'immuno-concentrat sur une gélose spécifique. Cette méthode est commercialisée par l'industriel bioMérieux.
- A côté de cette méthode immuno-enzymatique, existe une autre méthode, fondée sur la PCR en temps réel et utilisant l'automate BAX, commercialisé par l'industriel OXOID. Lors de résultats positifs avec cette méthode, il faut confirmer ceux-ci en procédant à une immuno-séparation magnétique et tester les colonies suspectes.

Chacune de ces méthodes est validée AFNOR Certification notamment pour mener les analyses de viande hachée avec une phase d'enrichissement de 8h et une prise d'essai de 25g.

Des travaux sont en cours par des industriels fournisseurs, visant d'une part, à augmenter la prise d'essai à 75g voire 375g de viande hachée, et d'autre part à diminuer la phase d'enrichissement à une durée totale de 5 à 6h.

En complément de ces deux méthodes, un milieu sélectif, nommé RAPID'E.coli O157:H7 (Bio-Rad), a reçu la marque AFNOR Validation. Il combine des substrats chromogéniques et des indicateurs biochimiques. Cependant, tous les échantillons détectés positifs à l'issue de l'isolement sur ce milieu doivent être confirmés à partir des colonies isolées, selon les tests classiques.

Les performances de ces méthodes alternatives (consultables sur le site <http://www.afnor-validation.org>) ayant été validées par AFNOR Certification, le groupe recommande que tout résultat présomptif positif obtenu par l'une ou l'autre de ces méthodes soit associé à une réaction rapide de l'industriel avec blocage des lots notamment pour des produits extrêmement périssables comme la viande hachée réfrigérée.

**B) Précisions relatives à la problématique du diagnostic des souches de *E. coli* non-O157 :**

L'EFSA dans son rapport publié en fin d'année 2007 (Anonyme 2007) s'accorde sur le fait que les *E. coli* O157:H7 ne sont pas les seules souches d'*E. coli* productrices de shigatoxine (STEC) impliquées dans les contaminations humaines. Le document souligne clairement la nécessité d'assurer la mise en place d'un plan de surveillance des souches de STEC et d'identifier les souches pathogènes pour l'homme sans donner toutefois une définition claire de ce que l'on considère par « STEC pathogène ».

Néanmoins, le rapport recense dans les états membres pour la période 2002-2006 les sérogroupes de STEC isolés dans les cas humains impliquant un syndrome hémolytique et urémique (SHU) (données Enter-Net). On note (Table 4, page 15 du rapport) la

prépondérance de 5 sérogroupes majeurs, classés par ordre décroissant: O157, O26, O145, O103 et O111. Le sérotype O91 apparaît en sixième position avec un seul cas rapporté de SHU sur la période 2002-2006.

Sur la base, entre autre de ce rapport, mais également des données de la littérature (Karmali *et al.* 2003) un groupe de travail 'ad hoc STEC' du CEN-TC275-WG 6, chargé de mettre en place une méthode normalisée pour la détection des souches de STEC non-O157 dans les aliments et les fèces, a proposé une approche analytique qui a reçu un accord lors de la dernière réunion du CEN-TC275/WG6 en mai 2008. Les informations dont dispose l'Afssa à ce jour laissent prévoir que cette proposition devrait prendre très rapidement la forme d'une « Spécification Technique (TS) CEN-ISO » qui sera publiée pour une période de 3 ans au delà de laquelle, sur la base de l'expérience acquise sur la mise en œuvre de la méthode, la TS sera révisée, abandonnée ou transformée en norme CEN ISO.

Considérant les différents gènes de virulence et la variabilité associée (c'est à dire les différents variants *stx* et *eae*), considérant les différents sérotypes d'*Escherichia coli* impliqués dans le groupe des STEC, considérant que tous les STEC ne sont pas des pathogènes pour l'homme, le groupe du CEN a conclu qu'il était nécessaire de proposer une méthode d'analyse capable de renseigner rapidement et simplement ces paramètres multiples. Parmi les technologies existantes à ce jour (culture et milieux d'isolement, ELISA, immunoséparation magnétique, détection d'ARN ribosomal, PCR), seule la PCR permet actuellement d'obtenir des réponses multiparamétriques sur l'analyse d'un échantillon alimentaire et dans un temps réduit, car elle peut cibler et amplifier plusieurs cibles génétiques simultanément. C'est une telle approche que le groupe du CEN a donc adopté.

#### **B.1- Projet de spécification technique (sur dires d'expert en juin 2008, projet susceptible d'être modifié):**

Brièvement, la TS propose de rechercher les marqueurs suivants :

- présence de *stx* (1 et/ou 2) ;
- présence de *eae* ;
- présence d'O157 ;
- présence d'O145, O111, O103 et / ou O26.

Le groupe estime pertinent de rechercher également les variants des gènes *eae* et *stx* et des marqueurs génétiques des flagelles.

La recherche de ces marqueurs doit permettre d'évaluer et de gérer le risque de contaminations humaines par des aliments, et ainsi renforcer la protection des consommateurs. Les tests actuellement commercialisés et les marqueurs génétiques ciblés par ces derniers sont présentés dans le Tableau 1.

La liste des sérotypes sera amenée à évoluer en fonction des cas humains de SHU et de l'importance épidémiologique des différents sérotypes, la prévalence de chaque sérotype étant en partie dépendante des régions du globe et des habitudes alimentaires.

Le projet de « Spécification Technique (TS) CEN-ISO » pour la recherche des STEC comprend donc les étapes suivantes :

- **Enrichissement** : 25g de l'échantillon homogénéisé dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée ou de mTSB, supplémenté par 16 mg/l de novobiocine quel que soit le choix du milieu. L'incubation se fera à 37°C +/- 1°C pendant 18-24 heures.
- **Extraction de l'ADN** : l'extraction de l'ADN sera réalisée sur 1 ml de la suspension alimentaire enrichie. La méthode d'extraction est laissée libre, mais devra répondre aux critères définis pour la préparation de l'ADN décrits dans le document ISO 20837, 2006 : « *Microbiologie des aliments -- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments -- Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative* ».

D'une manière générale, pour les méthodes commercialisées utilisant les étapes préconisées dans la spécification technique, il faudra que les extractions des acides nucléiques permettent une sensibilité et une limite de détection suffisantes et qu'elles

éliminent par conséquent, les inhibiteurs de la *Taq* polymérase. Il est également important de rappeler à ce stade la nécessité d'utiliser un contrôle interne d'inhibition dans chaque échantillon testé pour garantir que le test ne soit pas affecté par les effets « matrice ».

- **Détection des gènes *stx* et *eae* en PCR en temps réel (1<sup>ère</sup> étape du dépistage) :** la détection des gènes *stx* sera réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrits par Perelle *et al.* (Perelle *et al.* 2004). La détection des gènes *eae* sera réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrites par Nielsen et Andersen (Nielsen and Andersen 2003).
- **Détection des gènes *rfbE*(O157), *wbdI*(O111), *wzx*(O26), *ihp1*(O145) et *wzx*(O103) en PCR en temps réel (2<sup>ème</sup> étape du dépistage) :**

***Cette deuxième étape du dépistage n'intervient que quand les échantillons ont été testés positifs à la fois pour *stx* et *eae* lors de la 1ère étape du dépistage.***

La détection des gènes marqueurs des sérogroupes O157, O111, O26, O145 pourra être réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrites par Perelle *et al.* (Perelle *et al.* 2004). La détection du gène marqueur du séro groupe O103 pourra être réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrits par Perelle *et al.* (Perelle *et al.* 2005).

Pour la réalisation des tests de PCR en temps réel, l'utilisation d'un contrôle interne d'inhibition est indispensable. On pourra utiliser alternativement un système commercial comme le TaqMan Exogenous Internal Positive Control (Applied Biosystems) qui contient une sonde TaqMan ou un contrôle interne basé sur le plasmide pUC19 tel que décrit par Fricker *et al.* (Fricker *et al.* 2007).

A ce stade, les résultats positifs ne sont que des signes présomptifs de la présence d'un danger bactériologique. L'isolement des souches et leur caractérisation sont essentiels pour conclure à la présence ou non d'un STEC pathogène (EHEC) dans la matrice testée.

- **Isolément :** l'isolement des souches se fera après une étape d'immunoséparation (ex : Dynabeads, Invitrogen) sur milieu TBX incubé 18-24h à 37°C. Pour le séro groupe O26 qui ne fermente pas le rhamnose contrairement aux autres *E. coli*, un milieu à base de rhamnose (RMAC) est disponible commercialement.

Les colonies isolées devront être identifiées comme *E. coli* par les galeries biochimiques conventionnelles et confirmées positives par la mise en évidence des gènes *stx*, *eae* et marqueurs de séro groupe. Le Laboratoire national de référence (LNR) réalisera une analyse plus fine et plus exhaustive des facteurs de virulence. Ceci permettra de préciser le virulence potentielle de la souche.

L'interprétation des résultats en PCR en temps réel est la suivante :

- ***stx* négatif** : Absence de STEC dans 25g.
- ***stx* positif** : Présence présomptive de STEC dans 25g.
- ***stx* & *eae* positif, confirmé par l'isolement de la souche qui héberge les deux déterminants** : Présence de STEC potentiellement pathogène dans 25g.  
*Le groupe de travail recommande dans ce cas l'envoi de la souche au LNR pour une analyse plus fine et plus exhaustive permettant sur la base d'une approche MRA (Molecular Risk Assessment) d'identifier un EHEC.*
- ***stx* & *eae* positif, confirmé par l'isolement de la souche qui héberge les deux déterminants et qui appartient à un des sérogroupes majeurs (« Top-5 » : O157, O26, O145, O103 ou O111)** : Présence de EHEC dans 25g.  
*Le groupe de travail recommande dans ce cas l'envoi de la souche au LNR pour l'identification fine des antigènes flagellaires et sous-type *eae* correspondant aux EHEC typiques.*
- ***stx* & *eae* positif en l'absence d'isolement de la souche\*** : Présence présomptive de STEC potentiellement pathogène dans 25g.
- ***stx* & *eae* & marqueur du Top-5 positif en l'absence d'isolement de la souche \*** : Présence présomptive de EHEC dans 25g.

**\* en absence d'isolement d'une souche STEC, on ne peut pas conclure avec certitude à la présence de STEC car les marqueurs génétiques ne sont pas nécessairement hébergés dans une même souche.**



### **B.2- Validité des modèles proposés :**

Les différents modèles moléculaires de PCR en temps réel, tels qu'ils sont recommandés dans le projet de Spécification technique CEN-ISO, ont fait l'objet d'une évaluation complète vis à vis de l'ensemble des sérotypes actuellement décrits parmi les souches EHEC ainsi que des variants de *stx*. Les résultats de cette étude ont été présentés lors du congrès international de mars 2008 sur STEC « Pathogenic *E. coli* Network » et soumis à publication (Beutin *et al.* 2008, soumis à J. Appl. Microbiol.). Cette évaluation a été réalisée sur souches pures.

Ces modèles moléculaires sont actuellement utilisés sur des échantillons d'aliments ou sur fèces par le Laboratoire communautaire de référence (LCR) pour les STEC (ISS), le BfR (LNR allemand) et de nombreux autres pays européens (Hollande, Suède, Finlande, etc.). Leur évaluation sur des échantillons de terrain est donc engagée.

Les kits commercialisés, ou en voie de l'être, devraient être en cohérence avec l'approche retenue dans la future TS CEN/ISO. Il n'en demeure pas moins important que, en l'absence de validation possible par AFNOR Certification du fait du manque de méthode de référence normalisée, le LNR français et/ou le LCR évaluent ces tests, afin de leur donner une reconnaissance plus officielle, dans le cadre de la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009.

D'une manière générale, l'évaluation de ces méthodes devrait être menée selon le référentiel normatif NF EN ISO 16140:2003 qui établit le principe général ainsi que le protocole technique de validation des méthodes alternatives dans le domaine de l'analyse microbiologique des aliments. S'agissant des méthodes utilisant le principe de la PCR, l'évaluation menée pourra suivre, en complément du référentiel précité, les normes spécifiques à la PCR utilisées en microbiologie des aliments, issues du TAG2 3 du CEN/TC 275/WG 6 (Normes EN ISO 22118, 22119, 22174). Ces méthodes devraient être comparées au projet de spécification technique CEN-ISO pris en référence pour les besoins de cette évaluation.

La plupart des marqueurs génétiques pris en compte dans le projet de TS CEN ISO, décrit ci-dessus, a déjà été utilisée pour des études prospectives sur les aliments, notamment les viandes hachées et le lait cru (Perelle *et al.* 2007).

L'approche proposée dans la TS CEN ISO a également été reprise par la DGAL dans la réalisation des plans de surveillance nationaux annuels de 2005, 2006, 2007 et 2008 (Auvray *et al.* 2007).

### **B.3- Résultats du plan de surveillance 2007**

Lors du plan 2007, près de 4000 échantillons de viandes hachées et 400 échantillons de fromages au lait cru à pâte molle et à croûte fleurie ont été analysés. Le tableau 2 présente les résultats obtenus selon le protocole décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2006-8292 du 11 décembre 2006. Au total, 11 souches STEC pathogènes ont été isolées dont 6 n'appartenaient pas au sérotype O157:H7. Il s'agissait des sérotypes O103 (n=3), O26 (n=2) et O111 (n=1). Ce résultat confirme l'intérêt de ne pas se limiter au seul sérotype O157:H7. La prévalence de l'ensemble des EHEC typiques majeurs retrouvés dans ce plan de surveillance est très faible : 0,3% dans les steaks hachés et 0% dans les fromages au lait cru (note de service DGAL/SDSSA/N2008-8103 du 30 avril 2008).

Ces résultats mettent en évidence la proportion non négligeable d'échantillons contaminés de manière présumptive par des EHEC en comparaison de la faible proportion des EHEC finalement confirmés.

---

<sup>2</sup> TAG : Task Group ou Groupe de projets

- Concernant les échantillons de fromage (n= 392 ) :
  - 11.7% d'entre eux révélaient la présence de gène(s) *stx*,
  - 8.7 % d'entre eux révélaient la présence de gène(s) *stx* et *eae*,
  - 3.8 % d'entre eux révélaient la présence de gène(s) *stx*, *eae* et d'au moins un déterminant génétique d'appartenance à un des sérogroupes majeurs (Top-5) (n=15).

Finalement, aucun échantillon n'a été confirmé par isolement.

- Concernant les échantillons de viandes hachées (n= 3 605 ) :
  - 27,6% d'entre eux révélaient la présence de gène(s) *stx*,
  - 5% d'entre eux révélaient la présence des gènes *stx* et *eae*,
  - 3,6% d'entre eux révélaient la présence des gènes *stx*, *eae* et d'au moins un déterminant génétique d'appartenance à un des sérogroupes majeurs (Top-5) (n=129).

Parmi les 129 échantillons révélés contaminés par des souches appartenant aux sérogroupes du Top-5, la proportion d'échantillons ayant abouti à l'isolement de STEC puis à la confirmation de souches finalement pathogène (EHEC) se répartit de la manière suivante:

Sérogroupe	(n)	Nombre (%) d'échantillons analysés ayant conduit à l'isolement	Nombre (%) de souches EHEC parmi les souches isolées
O26	18	6 (33%)	2 (33%)
O103	63	13 (21%)	3 (23%)
O111	8	1 (12,5%)	1 (100%)
O145	21	1 (5%)	0 (0%)
O157	21	5 (24%)	5 (100%)
Top-5	129*	26 (20%)	11 (42%)

\* : certains échantillons peuvent contenir plusieurs sérogroupes.

Différentes caractéristiques du protocole actuel de la spécification technique pour la détection des STEC non-O157 peuvent expliquer la faible proportion d'échantillons finalement confirmés contaminés par des EHEC parmi les échantillons qui ont révélé une amplification des cibles génétiques recherchées.

#### **B.4- Précisions relatives aux limitations actuelles de la spécification technique pour la détection des STEC non-O157 :**

La méthode décrite plus haut présente des limites décrites ci-dessous :

- Aucune méthode (commerciale ou non) n'a fait l'objet à ce jour d'une évaluation conformément au référentiel normatif NF CEN ISO 16140:2003 sur matrice alimentaire volontairementensemencée avec des souches stressées appartenant à chacun des 5 sérogroupes majeurs de STEC et dont les résultats seraient publiés à ce jour.
- Aucun essai, dont les résultats auraient pu être communiqués au gestionnaire du risque, n'a permis d'éprouver sur site industriel les méthodes commerciales et de savoir quel était le pourcentage d'échantillons présentant des résultats PCR *eae*<sup>+</sup> et *stx*<sup>+</sup>, et positifs également pour un des 5 sérogroupes ciblés ET non confirmés par l'isolement de la souche STEC pathogène.
- D'autre part, Il est important de souligner que dans la spécification technique pour la détection des STEC non-O157, une relative souplesse est laissée pour la phase d'enrichissement. Il apparaît fondamental d'optimiser cette phase d'enrichissement avec ajout le cas échéant de substances antibiotiques, un choix pertinent de la température d'incubation et la détermination de la durée optimale de cet enrichissement pour les 5 différents sérogroupes de STEC.

➤ Une autre limite de la spécification technique est l'absence de stratégies d'isolement efficaces à ce jour. En effet, comme le montrent les résultats du plan de surveillance 2007 de la DGAL, la performance de l'étape de séparation immuno-magnétique demeure perfectible. Ceci se traduit *in fine*, par des boîtes d'isolement présentant un grand nombre de colonies.

Aucun milieu d'isolement n'est aujourd'hui disponible pour détecter spécifiquement *E. coli* O111, O145 et O103, contrairement aux souches de sérogroupes O157(:H7) et O26. Cette faiblesse implique la réalisation de plusieurs PCR pour trouver la colonie de *E. coli* appartenant à l'un des 5 sérogroupes recherchés et ainsi confirmer les résultats présomptifs. Malgré les recommandations de mise en œuvre d'une analyse PCR sur plusieurs pools de colonies, figurant actuellement dans le projet de la spécification technique, le nombre de PCR à réaliser reste important.

Des publications récentes de Possé *et al.*, concernant le développement de nouveaux milieux pour isoler les souches appartenant aux 5 sérogroupes majeurs O26, O103, O111, O145 et O157, laissent penser qu'une optimisation de l'étape d'isolement sera possible (Posse *et al.* 2008a; Posse *et al.* 2008b). L'évaluation de ces milieux, effectuée à ce jour avec des isolats cliniques, devra être réalisée avec des souches isolées des aliments. Ces milieux devront également être évalués à partir de différentes matrices (lait cru, fromage, viande bovine, fèces).

**Tableau 1 : Liste des méthodes commercialisées permettant la recherche des STEC non-O157 dans les industries agroalimentaires.**

Liste établie au 13 octobre 2008.

Société	Produit	Site web	Technologie	Marqueurs	Validation
BioControl Systems	Assurance GDS Shiga Toxin Genes	<a href="http://www.rapidmethods.com/products/gdsshiga.html">http://www.rapidmethods.com/products/gdsshiga.html</a>	PCR temps réel	gènes stx	AOAC Official Method 2005.05
GeneSystems	GeneDisc	<a href="http://www.genesystems.fr/ecoli.asp">http://www.genesystems.fr/ecoli.asp</a>	PCR temps réel	gènes stx, eae, O157:H7, O26, O103, O111, O145	-
Denka-Seiken	VTEC RPLA Screen	<a href="http://www.denka-seiken.co.jp/english/products/bacteriology/escherichiaColi.html">http://www.denka-seiken.co.jp/english/products/bacteriology/escherichiaColi.html</a>	RPLA	Protéines Stx	-
Meridian Bioscience	Premier EHEC	<a href="http://www.mdeur.com/products/608096.htm">http://www.mdeur.com/products/608096.htm</a>	ELISA	Protéines Stx	-
Merck KGaA	Duopath Verotoxins		Immuno chromatographie	Protéines Stx	AOAC-RI 020402
r-Biopharm	Ridascreen Verotoxin	<a href="http://www.r-biopharm.com/product_site.php">http://www.r-biopharm.com/product_site.php</a>	ELISA	Protéines Stx	-
Invitrogen	Dynabeads	<a href="http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Clinical-and-Diagnostic/Applications/BioDefense-and-Pathogen-Detection.html">http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Clinical-and-Diagnostic/Applications/BioDefense-and-Pathogen-Detection.html</a>	Immuno séparation (billes magnétiques)	E. coli O157 EPEC/TEC O26, O103 O111, O145	AFNOR pour O157

**Tableau 2 : Résultats des analyses réalisées dans le cadre du plan de surveillance DGAL 2007** selon la note de service DGAL/SDSSA/N2006-8292 du 11 décembre 2006 .

	Nb d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons stx+	Nombre de stx+, eae+	Nombre de stx+, eae+ et l'un <u>au moins</u> des 5 sérogroupes	Nombre d'échantillons analysés ayant conduit à l'isolement
<b>Analyses Viande hachée – PS DGAL 2007</b>					
Résultats du LERQAP <sup>3</sup>	251	32	9	8	
			O26	2	0
			O103	1	0
			O111	0	0
			O145	7	0
			O157	0	0
Résultats du LNR <sup>4</sup>	3354	964	172	121	
			O26	16	6 (2 EHEC)
			O103	62	13 (3 EHEC)
			O111	8	1 (1EHEC)
			O145	14	1(non EHEC)
			O157	21	5 O157:H7
<b>Analyses Fromage – PS DGAL 2007</b>					
Résultats du LERQAP	61	22	15	15	
			O26	11	1 (non EHEC)
			O103	12	0
			O111	0	0
			O145	15	1 (non EHEC)
			O157	3	1 (non EHEC)
Résultats du LNR	331	24	19	0	0

<sup>3</sup> les références des modèles moléculaires utilisés étaient les suivantes :

- stx : PCR-ELISA (Fach *et al.* 2001)
- eae : PCR en temps réel (Nielsen *et al.* 2003)
- O26, O111, O145 et O157 : PCR en temps réel (Perelle *et al.* 2004)
- O103 : PCR en temps réel (Perelle *et al.* 2005)

<sup>4</sup> les références des modèles moléculaires utilisés étaient les suivantes :

- stx : PCR conventionnelle (Read *et al.* 1992; Cebula *et al.* 1995) ;
- eae : PCR conventionnelle (China *et al.* 1996) ;
- O26 : PCR conventionnelle (DebRoy *et al.* 2004);
- O111 : PCR conventionnelle (Paton and Paton, 1998) ;
- O145 : PCR conventionnelle (Feng *et al.* 2005) ;
- O103 : PCR conventionnelle et temps réel (Fratamico *et al.* 2005) ;
- O157 : PCR conventionnelle (Cebula *et al.* 1995) ;