

ESCHERICHIA COLI VÉROCYTOTOXINOGENE

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux du tractus gastro-intestinal de l'animal et de l'homme. Certaines souches ont acquis le pouvoir très particulier de causer des diarrhées et de nombreuses affections extra-intestinales. Depuis 1977, certaines souches de *E. coli* responsables de diarrhées ont été reconnues capables de produire des toxines qui ont un effet cytopathogène irréversible sur des cultures de cellules Vero. Ces *E. coli* dits vérocytotoxinogènes (VTEC pour Verocytotoxigenic *E. coli*) appartiennent à plus de 100 sérotypes différents. *Escherichia coli* O157:H7, qui est le sérotype le plus important et le plus virulent, appartient à un sous-groupe pathogène de VTEC appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC pour Enterohaemorrhagic *E. coli*). Cette appellation tient au pouvoir qu'ont ces EHEC de provoquer des colites hémorragiques ainsi qu'un syndrome d'urémie hémolytique chez l'homme, de produire des vérocytotoxines, de créer des lésions d'attachement-effacement sur les cellules épithéliales et enfin de posséder un plasmide de grande taille très caractéristique. Au cours des vingt ans passés, le VTEC O157:H7 est devenu un problème de santé publique d'importance croissante au niveau mondial. D'autres sérogroupes non-O157, notamment les sérogroupes O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 et O145, ont été associés à des foyers occasionnels de maladie chez l'homme, les autres sérogroupes étant associés à des cas sporadiques. Les ruminants constituent le principal hôte des VTEC et sont, en général, des porteurs sains de ces microorganismes. Des VTEC ont aussi été isolés de porcs, de chats, de chiens, de poules et d'oiseaux sauvages. Les bovins sont considérés comme le principal réservoir des infections humaines par *E. coli* O157:H7. Malgré son pouvoir pathogène pour l'homme, *E. coli* O157:H7 n'entraîne jamais de signes cliniques chez les animaux. En revanche, les EHEC appartenant aux sérogroupes, O26, O111 et O103 peuvent être pathogènes aussi bien pour l'homme que pour les animaux. C'est la présence de VTEC dans les fèces des animaux qui permet à ces agents pathogènes de gagner la chaîne alimentaire par contamination fécale des produits laitiers, par contamination de la viande à partir du contenu intestinal lors de l'éviscération en abattoir ou par contamination des fruits et légumes venus au contact du fumier. Les VTEC sont également transmis par l'eau de boisson contaminée et par contact direct avec des êtres humains ou des animaux infectés.

Identification de l'agent pathogène : des méthodes de diagnostic ont été mises au point pour les VTEC, surtout pour *E. coli* O157:H7, visant à surmonter les problèmes que posent l'isolement d'un petit nombre des germes en cause qui se trouvent dans des produits organiques complexes tels que les fèces des animaux ou les prélèvements effectués à partir d'aliments ou d'animaux malades. L'identification de *E. coli* O157:H7 chez des animaux porteurs sub-cliniques dépend de l'enrichissement préalable des échantillons de fèces dans un milieu liquide généralement constitué d'eau peptonée tamponnée, additionnée ou non de vancomycine, cefsulodine et cefixime ; le prélèvement est incubé 6 h à 37 °C dans ce milieu, puis traité par un procédé de séparation immunomagnétique employant des particules paramagnétiques ou des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de *E. coli* O157. Les billes sur lesquelles se sont fixées les bactéries sont ensuite ensemencées sur une gélose sélective, généralement une gélose MacConkey à 1 % de sorbitol additionnée de cefixime et de tellurite de potassium, qui est incubée 18 h à 37 °C. L'identification de *E. coli* à partir des colonies ne fermentant pas le sorbitol est confirmée par des épreuves biochimiques ou par une agglutination par le sérum ou le latex, démontrant la présence de l'antigène somatique et/ou de l'antigène flagellaire de *E. coli* O157. Le pouvoir pathogène possible de ces bactéries pour l'homme est confirmé par la mise en évidence de la production d'une vérocytotoxine sur cellules Vero, à l'aide de la technique immuno-enzymatique (ELISA) ou des épreuves d'agglutination ou la démonstration, par une réaction en chaîne

d'amplification par polymérase (PCR), de l'existence de gènes codant la vérocytotoxine. La détection des VTEC non-O157 repose sur une analyse directe de colonies qui se sont développées sur des géloses non sélectives en réalisant par exemple, un immunoblot ou en employant une sonde ADN capables de détecter la production de vérocytotoxine. De nombreuses épreuves immunologiques ou de reconnaissance des acides nucléiques ont été décrites, qui visent à permettre un diagnostic d'orientation plus rapide des VTEC, et plusieurs sont commercialisées. Le typage par les bactériophages et l'électrophorèse en champ pulsé sont très utilisés par les Laboratoires de référence pour déterminer les sous-types de VTEC O157 en vue d'études épidémiologiques.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques ne sont pas utilisées en routine pour diagnostiquer les infections par VTEC des animaux, mais il a été démontré que les bovins infectés élaboraient des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de *E. coli* O157 et que ces anticorps pouvaient être détectés par ELISA.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas actuellement de vaccins permettant de prévenir l'infection par les VTEC chez l'homme ou l'animal, mais différents vaccins sont en cours de développement à titre expérimental.

A. INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux de l'appareil digestif des animaux et des êtres humains. Seules certaines de leurs souches se sont étroitement adaptées au point d'entraîner des diarrhées et diverses affections extra-intestinales. Les *Escherichia coli* sont caractérisés, en routine, par l'identification sérologique de leurs antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K. Toutefois, tandis que certains sérotypes sont régulièrement associés à des affections cliniques, dans les autres cas la distinction entre souches pathogènes et souches normalement présentes dans la flore intestinale nécessite une identification des facteurs de virulence. Depuis 1977, certaines souches « diarrhéogènes » de *E. coli* se sont avérées capables de produire des toxines ayant un effet cytopathogène irréversible sur des cultures de cellules Vero (19). Ces *E. coli* vérocytotoxinogènes (VTEC pour Verocytotoxigenic *E. coli*) appartiennent à plus de 100 sérotypes différents (16, 33). Ils sont aussi décrits comme des *E. coli* producteurs de Shiga toxine (Shiga toxin-producing *E. coli* : STEC) du fait de la similarité qui a été démontrée entre les vérocytotoxines (VT) et les Shiga toxines (Stx) de *Shigella dysenteriae* (28). Au cours des vingt dernières années, les VTEC O157:H7 ont pris une importance croissante au niveau mondial du fait de leur impact sur la santé publique. *Escherichia coli* O157:H7 est le principal et le plus virulent des sérotypes d'un sous-groupe pathogène de VTEC, appelés *E. coli* entérohémorragiques (enterohaemorrhagic *E. coli* : EHEC). Cette appellation tient au pouvoir qu'ils ont de provoquer des colites hémorragiques et un syndrome d'urémie hémolytique chez l'homme, à leur capacité à produire des VT, à leur capacité de créer des lésions d'attachement-effacement sur les cellules épithéliales et enfin à la possession d'un plasmide de grande taille très caractéristique (27). D'autres sérogroupes non-O157, notamment les sérogroupes O26:H11, O104:H21, O111:H– et O145:H–, ont été associés à des foyers occasionnels de maladie chez l'homme, les autres sérogroupes étant associés à des cas sporadiques (16).

Les ruminants constituent le principal hôte naturel des VTEC et sont, en général, porteurs sains. Des VTEC ont aussi été isolés des porcins, des chats, des chiens, des poules et d'oiseaux sauvages : ces espèces peuvent être colonisées de façon transitoire par les microorganismes (4, 16). Des enquêtes ont démontré que normalement les souches O157 ne constituaient qu'une minorité des VTEC qui colonisent l'intestin des animaux. C'est la présence de ces VTEC dans les fèces animales qui leur permet de s'introduire dans la chaîne alimentaire par contamination fécale du lait, contamination de la viande par le contenu du tube digestif des animaux à l'abattoir, ou contamination des fruits et légumes par du fumier contaminé. Les VTEC sont également transmis par l'eau de boisson ou par contact direct avec des personnes, des animaux ou des déchets d'origine animale. L'eau contaminée utilisée pour l'irrigation ou le lavage des légumes peut aussi être une source d'infection pour l'homme ou les animaux. Les bovins sont considérés comme le principal réservoir d'infection de l'homme par *E. coli* O157:H7, quoique que cette bactérie ait été également isolée de nombreux autres animaux de rente, de chevaux, de chiens, de lapins, d'oiseaux et de mouches. Bien que *E. coli* O157:H7 puisse provoquer une sévère maladie chez l'homme (29), l'infection qu'il entraîne chez l'animal est toujours infraclinique. Certains sérotypes non-O157, cependant, sont pathogènes pour les animaux et l'homme, notamment les sérotypes O26:H11 ; O103:H2 et O111:H– (3, 16).

Des VTEC sont également associés à la maladie œdémateuse du porcelet. Les 4 sérotypes responsables de la majorité des foyers de cette maladie dans le monde sont O45:K+, O138:K81, O139:K82 et O141:K–. Les principaux facteurs de virulence sont une adhésine fimbriale, dite F18, impliquée dans la colonisation de l'organisme, et la toxine VT2, qui est responsable des signes cliniques. L'existence d'une étroite parenté antigénique a été démontrée entre les souches O101 possédant les gènes stx2e d'origine humaine et porcine. Le

rôle des porcs, porteurs sub-cliniques de STEC, dans l'épidémiologie de la maladie humaine devrait donc faire l'objet de recherches complémentaires.

E. coli O157:H7 étant devenu le VTEC le plus important sur le plan zoonotique, des méthodes de diagnostic ont été développées pour détecter ce sérotype de manière sélective en cas de maladie humaine (33) ou dans les aliments (34). Pour ces derniers, une méthode de détection internationale normalisée et validée est disponible (EN ISO 16654:2001). Dans ce chapitre, toutefois, l'accent sera mis sur l'isolement et l'identification du sérotype O157 et d'autres VTEC présents chez les animaux qui en sont porteurs sains (11).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

• Prélèvements

Le plus souvent, les prélèvements à effectuer sur l'animal pour isoler les VTEC seront les fèces récoltées dans le cadre d'une surveillance sanitaire ou dans celui d'une enquête épidémiologique recherchant la trace de l'agent pathogène responsable de cas humains. Les échantillons à tester peuvent être soit des prélèvements réalisés au niveau du rectum, soit des matières fécales fraîchement émises sur le terrain ou récoltées dans l'intestin d'animaux à l'abattoir. Il existe une grande variété de VTEC chez les animaux en bonne santé, et tous ne sont sans doute pas pathogènes pour l'homme. *Escherichia coli* O157:H7, qui est le plus important des VTEC en médecine humaine est hébergé sans signes cliniques notoires par l'animal. Les bovins sont probablement les réservoirs les plus importants de ce sérotype. Dans un troupeau infecté, l'infection ne pourra être détectée que chez certains animaux, les bactéries étant généralement peu nombreuses chez les sujets porteurs et n'étant présentes que de façon intermittente dans leurs fèces. L'excrétion de *Escherichia coli* O157:H7 dépend de l'âge des animaux, de leur alimentation, du stress qu'ils subissent, de la densité de leur population, de la région où ils se trouvent et de la saison (25). Certains animaux contribuent vraisemblablement de façon disproportionnée à la transmission de l'infection et sont, de ce fait, appelés « super-excréteurs » (24). Le taux de réussite des isolements bactériens peut être amélioré en préférant le prélèvement de fèces au raclage de la muqueuse rectale, en augmentant le nombre de prélèvements ainsi que le nombre des animaux objets de ces prélèvements et en répétant les prélèvements. L'utilisation d'écouvillonnages de la muqueuse recto-anale est réputée améliorer la détection des animaux colonisés par rapport aux animaux infectés de manière transitoire. Des précautions devront être prises pour éviter une contamination croisée des échantillons lors de leur acheminement, puis au laboratoire. Ils devront être conservés sous froid et mis en culture le plus rapidement possible après leur récolte.

• Sécurité

Les échantillons, pouvant contenir des VTEC, devront être manipulés avec précautions, sachant que la quantité de bactéries capable d'entraîner de graves infections chez l'homme peut être très faible (de l'ordre de 100 VTEC O157:H7) et que des infections sont déjà survenues au laboratoire (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

• Isolement

a) Milieux d'enrichissement liquides

En routine, les prélèvements sont ensemencés directement sur milieux solides pour isoler *E. coli*, mais les VTEC recherchés dans les fèces de porteurs sains étant généralement peu nombreux, leur isolement sera facilité par culture dans des milieux d'enrichissement liquides. Les milieux de culture d'enrichissement liquides sont généralement constitués d'eau peptonée tamponnée sans complément (bonne croissance mais pas spécifique) ou additionnée de 8 mg/litre de vancomycine, de 10 mg/litre de céfsulodine et de 0,05 mg/litre de céfixime (BPW-VCC), afin d'inhiber la croissance des bactéries prenant la coloration de Gram, ainsi que celle d'*Aeromonas* spp. et de *Proteus* spp. ; de bouillon modifié « trypticase-soy : mTSB » additionné de 20 mg/litre de novobiocine ou de 10 mg/litre d'acriflavine afin de réduire la croissance des bactéries prenant la coloration de Gram ; ou enfin de bouillon modifié pour *E. coli* additionné de 20 mg/litre de novobiocine (mEC+n). Les EHEC *E. coli* poussent mal à 44 °C. Pour réduire au minimum la croissance exagérée des autres germes, l'incubation optimale des fèces de bovins est de 6 h à 37 °C. Pour les prélèvements de viande, c'est un enrichissement durant 6 h entre 41 et 42 °C qui est retenu, et pour les eaux et les produits laitiers, 24 h entre 41 et 42 °C. Un pré-enrichissement non sélectif est nécessaire pour revivifier les *E. coli* O157 lorsqu'ils ont subi un stress et se retrouvent en petit nombre. Les bouillons d'enrichissement doivent être préchauffés afin d'éviter un choc *a frigore* aux bactéries et un ralentissement de leur croissance initiale ; une incubation de 24 h peut améliorer le taux de recouvrement des bactéries qui auraient subi un stress.

b) Séparation immunomagnétique

La séparation immunomagnétique (IMS pour *Immunomagnetic Separation*) a été employée en tant que technique de concentration sélective pour faciliter l'isolement des *E. coli* O157:H7, lorsqu'ils sont en nombre réduit (10). Des particules électromagnétiques disponibles dans le commerce, ou des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie, sont mélangés avec une partie aliquote du bouillon de culture. Les billes sur lesquelles se sont fixées les bactéries sont séparées du surnageant sous l'action d'un champ magnétique et, après lavage, sont ensemencées sur une gélose sélective qui est incubée 18 h à 37 °C pour isoler les colonies suspectes. La technique est spécifique de sérotype. Il existe dans le commerce des systèmes permettant une séparation manuelle ou automatique (9). Le taux de récupération dépend de la proportion de bactéries fixées aux billes, le ratio optimum étant de 3/1 ; il dépend également de la nature du bouillon d'enrichissement utilisé et du problème de l'adsorption non spécifique de *E. coli* aux billes magnétiques, cette adsorption non spécifique pouvant être réduite par l'emploi d'une solution de faible force ionique dans le procédé IMS et par un lavage soigneux des billes. Ces facteurs doivent être pris en compte lorsqu'on vise à maximiser la sensibilité de la technique de détection des *E. coli* que l'on recherche en particulier.

c) Culture sélective des *Escherichia coli* O157

Aucune caractéristique biochimique ne distingue la majorité des VTEC des autres *E. coli*, bien que l'incapacité dans laquelle se trouvent la plupart des souches de *E. coli* O157:H7 de fermenter rapidement le D-sorbitol et le fait qu'elles soient dépourvues de bêta-glucuronidase puissent être exploités pour les isoler et les identifier. Néanmoins, les isolats relativement rares de *E. coli* O157:H- qui fermentent le sorbitol et possèdent une bêta-glucuronidase (dépourvus de mobilité du fait de la non expression de l'antigène H7), ne pourront être identifiés s'ils sont isolés sur des milieux choisis pour sélectionner des bactéries ne possédant pas ces deux caractéristiques (18). La gélose MacConkey, qui contient 1 % de D-sorbitol au lieu de lactose (SMAC) est un milieu pratique et bon marché sur lequel les *E. coli* ne fermentant pas le sorbitol se développent sous forme de petites colonies blanc-grisâtres. La sélectivité de ce milieu est encore améliorée par l'addition de 0,5 % de rhamnose, et de 0,05 mg/litre de céfixime (CR-SMAC), ce qui réduit la croissance de *Proteus* spp. Mais l'addition de rhamnose reste une opération onéreuse, alors que peu de colonies suspectes requièrent l'utilisation de ce milieu. Une modification alternative consiste à ajouter 2,5 mg/litre de tellurite de potassium au céfixime (CT-SMAC), le résultat étant un effet inhibiteur plus marqué sur les *E. coli* non-O157 et sur les autres bactéries qui ne fermentent pas le sorbitol, tels que les genres *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Morganella* et *Providencia*, que sur *E. coli* O157 (28). C'est actuellement le milieu le plus utilisé pour isoler *E. coli* O157.

Des milieux contenant des glucuronides fluorogéniques ou chromogéniques sont utilisés pour distinguer les *E. coli* O157:H7 ne produisant pas de bêta-glucuronidase des *E. coli* qui en produisent. L'hydrolyse du 4-méthylumbelliferyl-bêta-D-glucuronide (MUG) par la bêta-glucuronidase entraîne la formation d'un composé fluorescent visible en lumière ultra-violette. L'addition de 0,1 g/litre de 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-bêta-D-glucuronide (BCIG) au SMAC permet de différencier les colonies blanches de *E. coli* O157:H7 des colonies bleu-vertes des bactéries ne fermentant pas le sorbitol mais possédant une bêta-glucuronidase. Les milieux contenant des glucuronides fluorogéniques ou chromogéniques commercialisés figurent dans les catalogues spécialisés. Bien que des progrès aient été faits dans l'amélioration de la sélectivité des milieux vis-à-vis de *E. coli* O157:H7, le taux de succès de son isolement, notamment lorsque l'on a des germes stressés, peut être affecté du fait de l'emploi de ces additifs. Pour pallier ces effets, l'addition à la gélose tryptone-soy d'agents protecteurs tels que le pyruvate de sodium à 1 %, ou le fait de retarder l'exposition des germes stressés aux produits sélectifs, peut faciliter la récupération de la bactérie (8).

Des *E. coli* O157:H- fermentant le sorbitol ont été isolés de patients présentant de la diarrhée et un syndrome hémolytique et urémique, mais l'épidémiologie de l'infection n'est pas clairement élucidée et cet organisme n'a été isolé que très rarement d'animaux, y compris les bovins (22). La plupart des isolats de *E. coli* O157:H fermentant le sorbitol sont sensibles au tellurite et ne peuvent pas être identifiés sur CT-SMAC. Les analyses microbiologiques de cet organisme sont fastidieuses et impose la mise en culture sur SMAC des bactéries séparées par IMS et le testage de chaque colonie par agglutination au latex pour la recherche de l'antigène O157. Une autre méthode consiste à tester en PCR des colonies prélevées sur gélose pour vérifier la présence des gènes *vt₂*, *eae*, *rfb_{O157}* et *sfpA* (voir ci-dessous). Les colonies bien espacées sur gélose et positives en PCR sont ensuite testées pour hybridation avec les sondes des gènes *vt₂*, *eae* et *sfpA* ou par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques (18, 22).

d) Isolement des autres VTEC

Les VTEC non-O157 poussent bien sur des milieux permettant la croissance de *E. coli*, tels que la gélose au sang ou la gélose MacConkey, et la majorité d'entre eux ne peuvent se distinguer des autres *E. coli* que par leur pouvoir de production de VT. Le nombre élevé de sérotypes différents de VTEC interdit l'emploi d'antisérums O pour un tri de routine et une identification des colonies suspectes sur ces milieux. L'IMS peut être utilisée en vue d'une concentration sélective des sérogroupes O26, O103, O111 et O145 à partir d'un

échantillon pré-enrichi, comme pour les souches O157. Ces sérogroupes sont les VTECs non-O157 les plus souvent associés à des cas humains, et des billes sont disponibles dans le commerce.

Les souches O26 étant incapables de fermenter le rhamnose, des milieux ont été récemment développés qui peuvent s'avérer utiles pour distinguer les *E. coli* O26 du reste de la flore intestinale. Le premier de ces milieux est la gélose MacConkey rhamnosée (rhamnose-MacConkey agar : RMAC) dans laquelle le lactose est remplacé par 10 g/litre de rhamnose. L'addition de 2,5 mg/litre de tellurite de potassium et de 0,05 mg/litre de céfixime (CT-RMAC) améliorerait la sélectivité de ce milieu. Le second milieu est une gélose rhamnosée chromogénique incorporant 10 g/litre de rhamnose et 0,02 g/litre de rouge phénol à une gélose ES pour coliformes (un milieu indicateur de la présence de bêta-galactosidase), à laquelle sont ajoutés 0,5 mg/litre de tellurite de potassium et 0,05 mg/litre de céfixime. Sur ce milieu, les colonies O26 apparaissent bleues sombre à noires, les autres sérotypes de *E. coli* sont verts et les entérobactéries autres qu'*E. coli* sont vertes, jaunes ou incolores.

Un utile marqueur de virulence des VTEC est la production d'entérohémolysine, qui provoque l'hémolyse des hématies de mouton lavées après incubation durant une nuit sur gélose au sang additionnée de calcium. Cette production caractéristique d'hémolysine est aussi le fait de 90 % des *E. coli* producteurs de VT isolés lors d'infections humaines. Toutefois, on s'est aperçu qu'un certain nombre de VTEC pathogènes pouvaient ne pas produire d'entérohémolysine, ce qui réduit l'intérêt d'utiliser la gélose précédemment décrite pour trier les souches de VTEC.

Dans la plupart des cas, l'isolement des VTEC est réalisé en repérant directement sur la gélose les colonies productrices de VT par immunoblot ou par séquençage de l'ADN, afin de mieux les caractériser ensuite. Ces colonies sont d'abord repiquées, de façon à pouvoir disposer d'un double après avoir analysé la colonie originale. À partir de ces colonies, soit un immunoblot est réalisé sur des membranes appropriées (en nitrocellulose ou en nylon) permettant leur répliquation, soit les colonies sont prélevées et déposées dans des plaques de microtitrage à 96 trous contenant du bouillon de culture pour répliquer les colonies avant d'en transférer des aliquots sur des filtres appropriés. Les colonies sont alors analysées à l'aide de sondes nucléiques ou d'anticorps, de façon à identifier tous les VTEC (33). Hull *et al.* (14) ont mis au point une épreuve par immunoblot à la mytomycine qui permet de mettre en évidence les VTEC dans les fèces suffisamment facilement pour qu'elle soit utilisable en routine. Des dilutions en série des fèces effectuées en bouillon sont ensemencées sur des boîtes de gélose MacConkey, et incubées toute la nuit à 37 °C. En utilisant une méthode classique de duplication des colonies, la récolte d'une gélose (représentant environ 200 colonies) est transférée sur deux filtres de cellulose de 0,45 µm de porosité, eux-mêmes déposés sur des gélases Syncase additionnées de 25 ng de mitomycine/ml. Ce milieu induit une croissance végétative de bactériophages porteurs du gène de la VT et facilite l'expression de la toxine. (Il est aussi possible de déposer directement les suspensions de bactéries ou de matières fécales sur des plaques recouvertes d'un filtre). Les plaques sont incubées une nuit à 37 °C. Le lendemain, les filtres sont détachés des plaques, plongés 15 min dans un bain de chloroforme, puis 1 h dans du lait écrémé à 5 % en tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM et Tween 0,05 % (pH 8) (TNT). Les filtres sont incubés 1 h en présence d'antisérums dirigés contre VT1 ou VT2, lavés 3 fois 5 min en TNT, puis incubés 1 h en présence d'un sérum anti-immunoglobuline G conjugué à de la phosphatase alcaline, et lavés de nouveau 3 fois 5 min en TNT. La réaction éventuelle est mise en évidence par coloration au nitrobleu et au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate. Des *E. coli* non producteurs de VT1, VT2 ou VT sont inclus comme témoins dans l'épreuve. L'usage d'anticorps monoclonaux évitera l'inconvénient des faux résultats positifs observés avec les anticorps polyclonaux. Les résultats obtenus avec les sondes ADN sont comparables à ceux obtenus par l'épreuve immunoblot à la mytomycine, sur colonies. L'épreuve immunoblot a l'avantage d'être plus simple à réaliser que celle des sondes ADN. Les plaques à la mitomycine se conservent plus longtemps si elles sont placées dans l'obscurité à 4 °C.

L'épreuve immunoblot sur colonies et la méthode des sondes ADN sont très laborieuses, et il vaut donc mieux n'y recourir qu'après avoir repéré les prélèvements dans lesquels la VT ou les gènes de la VT ont été mis en évidence par ELISA ou par PCR.

• Identification et caractérisation des colonies suspectes

L'appartenance à l'espèce *E. coli* des bactéries ayant formé des colonies sur milieux solides et suspectes d'être des VTEC doit être confirmée par l'étude de leurs caractères biochimiques ou génotypiques (c-à-d par PCR *GadA*). Leurs antigènes somatiques « O » et flagellaires « H » sont identifiés sérologiquement. Tous les VTEC isolés des animaux ne sont pathogènes pour les humains. Certains isolats de *E. coli* O157, provenant des porcs, ne sont ni vérocytotoxigénique ni pathogène pour les humains. Le diagnostic doit donc inclure la mise en évidence chez ces isolats des facteurs de virulence connus. Il s'agit des vérocytotoxines VT1 (Stx1) et VT2 (Stx2) et de leurs gènes, ainsi que d'une protéine d'adhésion de la membrane externe, l'intimine, qui est codée par le gène *eae* (21). Pour les enquêtes épidémiologiques, les laboratoires de référence disposent de méthodes de sous-typage des souches de VTEC O157.

a) Tests biochimiques

Les VTEC ont des caractères biochimiques analogues à ceux des autres *E. coli*. Les souches de VTEC O157:H7 en diffèrent en ce qu'elles ne fermentent pas le sorbitol et n'ont pas de bêta-glucuronidase, mais fermentent le raffinose et le dulcitol. Les *Escherichia coli* peuvent être distingués des *E. hermanii* par le fait qu'ils ne se développent pas en présence de cyanure de potassium et ne fermentent pas la cellobiose, à l'inverse de *Escherichia hermanii*. Il y a 98 % des souches de *E. hermanii* qui produisent un pigment jaune caractéristique sur gélose nutritive, ce qui ne s'observe jamais avec les VTEC. L'appartenance à l'espèce *Escherichia coli* peut être confirmée en vérifiant que les bactéries dégradent le tryptophane et possèdent une bêta-galactosidase (voir ci-dessous), ou en utilisant des bandelettes diagnostic disponibles dans le commerce.

b) Épreuves sérologiques

Des kits au latex sont disponibles dans le commerce pour le diagnostic des colibacilles O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 et H7. Ces kits doivent être utilisés selon les instructions de leurs fabricants et des témoins latex ainsi que des germes témoins donnant des résultats d'analyse positifs ou négatifs doivent faire partie du test. Un diagnostic de suspicion peut également être porté par agglutinations sur lame ou en tube avec un sérum anti-LPS O (il existe des antisérums vis-à-vis des antigènes 181 O –). L'antisérum O est connu pour entraîner des réactions croisées vis-à-vis d'autres bactéries, dont *E. hermanii* (fréquent dans les aliments), *Salmonella* O groupe N, *Yersinia enterocolitica* sérotype O9 et *Citrobacter freundii*, ce qui oblige à vérifier que les colonies suspectes de VTEC sont bien des *E. coli*. La présence d'antigène flagellaire peut être recherchée dans les isolats (il existe des sérums anti-56 H), mais il faut alors cultiver la bactérie sur gélose mobilité. Certaines bactéries pathogènes sont immobiles.

c) Épreuve sur cellules Vero : production de vérocytotoxine (16)

L'épreuve sur cellules Vero reste la méthode de référence pour confirmer la production de VT (voir ci-dessous). Les membranes plasmiques des cellules Vero contiennent une grande quantité de globotriaosylcéramide (Gb₃) et de globotétraosylcéramide (Gb₄) qui sont les récepteurs sur lesquels se fixent les VT et permettent de détecter, en général, tous les variants de ces toxines. L'épreuve peut être réalisée sur des suspensions de matières fécales, des filtrats de cultures ou des cultures bactériennes vivantes. Dans le cas d'un mélange de matières fécales, la sensibilité de l'épreuve est améliorée par un traitement à la polymyxine B ou à la mytomycine, qui permet de libérer la toxine liée aux cellules. Bien que sensible, cette épreuve n'est pas pratiquée en routine dans la plupart des laboratoires de diagnostic. Elle demande en effet beaucoup de travail et ses résultats ne peuvent être obtenus que 3 à 4 jours après l'inoculation des cellules. Faute de cultures cellulaires, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour détecter la production de VT, notamment l'ELISA ou l'agglutination, et la PCR peut détecter les gènes *vt*. Toutes ces méthodes peuvent être maintenant appliquées à l'aide des kits disponibles dans le commerce.

d) Sous-typage de *Escherichia coli* O157 pour études épidémiologiques

De nombreuses méthodes sont appliquées dans les laboratoires de référence pour faciliter la distinction entre les différentes souches de *E. coli* O157:H7 dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en cas de contaminations humaines (13, 33). Ces méthodes varient en complexité technique, et il en faut plusieurs pour bien différencier les souches. Ces techniques comprennent le typage par les phages, le biotypage et la sensibilité aux produits antimicrobiens (la résistance des souches étant rare dans la plupart des pays), le profil plasmidique, le polymorphisme de restriction (RFLP pour *Restriction Fragment Length Polymorphism*), le ribotypage, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE pour *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) ainsi que différentes analyses basées sur la PCR telles que l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphique, la PCR répétitive de l'ADN ou le polymorphisme de restriction amplifié. Ce sont le typage par les phages et la PFGE qui sont les techniques les plus utilisées. En dépit de quelques difficultés dans l'interprétation des profils, la PFGE s'est imposée comme la technique de référence dans les laboratoires de santé publique pour le typage des VTEC O157 du fait de son grand pouvoir discriminant, de sa précision et de sa reproductibilité. Elle est employée par « Pulsenet », un réseau de laboratoires de santé publique qui utilise une méthode normalisée de PFGE permettant la comparaison des empreintes ADN répertoriées dans la base de données des « Centres for Disease Control and Prevention » des États-Unis d'Amérique (www.cdc.gov/ncidod/dbmd/pulsenet/pulsenet.htm). Dans l'Union Européenne, le système de surveillance « Enter-net » utilisé pour la surveillance des *Salmonella* et des VTEC repose en grande partie sur le sous-typage des souches *E. coli* O157:H7 par les phages. L'utilisation du sous-typage des gènes de l'intimine et des VT s'est révélée utile dans les études épidémiologiques et la recherche de la source de contamination (5, 6). Le sous-typage des sérotypes non-O157 a été moins bien étudié, mais peut bénéficier des approches utilisées pour le typage des VTEC O157.

- **Techniques de détection des VTEC ne nécessitant pas leur culture**

Bien que le diagnostic de certitude des VTEC repose sur l'isolement et la caractérisation d'une culture pure, la culture des VTEC est laborieuse et prend beaucoup de temps. C'est pourquoi de nombreuses épreuves immunologiques ou basées sur l'hybridation des acides nucléiques ont été développées en vue d'une identification rapide, dans les prélèvements, des antigènes O et H ainsi que de la VT ou des gènes associés à sa production. Ces épreuves de détection ayant une sensibilité insuffisante pour détecter le nombre relativement faible de bactéries cibles normalement présentes dans les fèces, leur application devra être précédée par une étape d'enrichissement du prélèvement (de préférence non sélective, de façon à isoler les bactéries endommagées ou stressées) ce qui augmentera le nombre de bactéries.

a) Méthodes immunologiques

Les épreuves immunologiques permettant de reconnaître les antigènes O et H et la VT peuvent être utilisées pour confirmer l'identité du germe une fois isolé des prélèvements effectués sur des malades, des aliments ou dans l'environnement. Les autres méthodes, y compris celles utilisant la technologie des membranes ou des bandelettes diagnostic (« dipstick »), les tests sur microplaques, les immunoblots sur colonie, l'immunofluorescence et l'ELISA sont utilisés pour détecter rapidement la présence de bactéries pathogènes suspectes dans les prélèvements, ce qui réduit ainsi les délais du diagnostic d'orientation. La plupart des épreuves visant à reconnaître les antigènes somatiques ou flagellaires sont conçues pour repérer le LPS O157 et l'antigène flagellaire H7. La recherche de la toxine a l'avantage de détecter tous les VTEC. Les épreuves immuno-enzymatiques pour O157 et VT, les épreuves sérologiques pour O157 lisibles à l'œil nu et les épreuves d'agglutination pour O157, H7 et VT sont réalisables avec des kits du commerce (7, 11, 27, 33). Toutes ces épreuves n'ont pas été validées pour une utilisation sur des fèces. Il existe aussi des réactifs spéciaux dans lesquels les anticorps du LPS O157 sont conjugués à la fluorescéine, la peroxydase ou la phosphatase. Parmi les diverses épreuves immuno-enzymatiques, c'est l'ELISA sandwich qui est le plus couramment utilisé. L'anticorps est lié à une structure porteuse de façon à capturer un antigène spécifique des VTEC ; après ajout d'un substrat approprié, un second anticorps couplé à une enzyme se fixe à cet antigène et le colore. Les kits de diagnostic correspondants ont été validés avec des protocoles de pré-enrichissement et des réactifs capables d'assurer des résultats reproductibles. Certains travaillent avec des échantillons chauffés, pour améliorer leur sécurité, ou automatisent l'analyse pour pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons. D'autres kits, comme les « blot ELISAs », ont été mis au point pour repérer les colonies dans lesquelles se trouve de l'antigène O157. Les kits du commerce ont l'avantage d'être facilement utilisés par un laboratoire non spécialisé, et les tests doivent être réalisés en suivant les instructions du fabricant. Les kits validés pour tester des échantillons d'aliments ou de carcasses animales, ou des prélèvements réalisés chez des patients, peuvent manquer de sensibilité lorsqu'on les emploie pour l'analyse des fèces d'animaux. Seules les épreuves immunologiques peuvent donner un résultat indicatif, qui doit être confirmé par l'isolement et la caractérisation des bactéries produisant soit l'antigène O157 soit la toxine. Des kits de diagnostic sont disponibles et les Laboratoires de référence de l'OIE doivent être en mesure d'apporter les informations les plus récentes les concernant.

b) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

i) *Épreuves d'hybridation des colonies*

L'hybridation des colonies est une technique utile pour repérer les VTEC au sein d'une population bactérienne hétérogène et de mieux les caractériser. Il existe des sondes ADN et les sondes d'oligonucléotides de synthèse marquées à la digoxigénine ou à la biotine, et donc utilisables dans des laboratoires non spécialisés. Il existe aussi des épreuves permettant de détecter les gènes VT, le plasmide de 60 MDa de *E. coli* O157 et les gènes *eae*, soit individuellement soit tous ensemble (27, 29, 33). Les épreuves d'hybridation sont moins sensibles lorsqu'il s'agit de détecter les VTEC dans des bouillons de culture ou des matières fécales.

ii) *PCR pour les gènes VT et autres marqueurs de virulence.*

De nombreuses techniques de PCR ont été publiées, qui permettent de détecter les gènes de VT1 et VT2 et les gènes variants de VT2 (27, 29, 33), et plusieurs des méthodes PCR permettant de typer les toxines ont été comparées récemment (36). Le fait de démontrer l'existence de gènes associés à la production de VT ne préjuge pas de l'expression de ces gènes et donc de la production de la toxine. La PCR peut être utilisée sur des cultures pures ou non, sur gélose ou en bouillon, et sur des extraits d'aliments ou de fèces. Elle peut également être utilisée pour détecter les gènes dans des bactéries non viables. Outre son rôle diagnostique, la PCR peut servir à trier les prélèvements effectués dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques sur les VTEC. L'amplification des gènes-cibles dans les ADN bactériens à partir d'extraits des fèces ne réussit pas aussi bien que lorsqu'elle est réalisée sur des cultures pures, et il faut donc soigneusement préparer les échantillons à tester si l'on veut améliorer la sensibilité de l'analyse. Les fèces contiennent des inhibiteurs non spécifiques de la PCR et il n'existe aucune méthode idéale pour les éliminer. La sensibilité de la PCR est améliorée par un pré-enrichissement non sélectif avant l'épreuve, mais reste inférieure à celle de l'IMS ou de la

recherche d'une cytotoxicité sur cellules Vero. Des kits de diagnostic utilisant la PCR sont disponibles dans le commerce.

Des sondes ADN, des tests de PCR et des micro-puces ont été aussi développées pour détecter d'autres gènes des VTEC reconnus comme virulents chez l'homme, notamment *eae* (codant l'intimine), *ehx* (codant l'entérohémostase), *fliC* (codant l'antigène H7), O157 *rfb* (codant le LPS O157), *uidA* (gène mutant de la glucuronidase des *E. coli* O157:H7 ne produisant pas de bêta-glucuronidase) et *katP* (un gène porté par le grand plasmide de *E. coli* O157:H7, qui code une nouvelle catalase peroxydase (2, 27, 29, 33). De nombreuses épreuves multiplexes ont été mises au point pour détecter simultanément plusieurs gènes utiles au diagnostic. Ces épreuves sont intéressantes pour des caractérisations à partir de cultures pures. Dans le cas des populations bactériennes existant dans les aliments ou les fèces, elles peuvent rendre service dans l'identification des échantillons à partir desquels un isolement devra être réalisé.

- **Tri des fèces en vue de la recherche de *Escherichia coli* O157:H7**

Escherichia coli O157:H7 est le VTEC le plus redouté en santé publique dans la plupart des pays. Son portage intestinal par des animaux sains, notamment les bovins, constitue une source directe ou indirecte de contagion pour l'homme. Le tri des prélèvements repose donc sur des techniques conçues pour résoudre les problèmes que pose l'isolement de petites populations bactériennes, éventuellement en état de stress et entourées d'une flore qui se trouve en compétition avec elles. Ce tri est suivi de l'identification des colonies suspectes et de la recherche des caractéristiques connues de virulence. Les techniques ne cessent d'évoluer et la description qui suit est celle des méthodes employées en routine par un laboratoire national. Les précautions appropriées devront être prises pour éviter toute contamination humaine (voir Chapitre 1.1.2.).

a) Pré-enrichissement

- i) Transporter les fèces dans des récipients stériles et hermétiquement fermés, maintenus à 4 °C, et ensemencer ces fèces dès que possible, de préférence dans les 2 h qui suivent leur récolte. Si les fèces doivent être conservées pour une longue période, elles seront placées à –70 °C ;
- ii) Mélanger les fèces diluées au 1/10 dans de l'eau peptonée tamponnée et réchauffée placée dans un récipient étiqueté ;
- iii) Incuber à 37 °C ± 2 °C pendant 6 h ;
- iv) Prévoir des cultures témoins positives et négatives.

b) Séparation immunomagnétique

- i) L'emploi du produit Dynabeads® anti-*E. coli* O157, 710.04 (Dyna Biotech, ASA, Oslo, Norvège) est agréé par l'AFNOR (DYN 16/02-0696 and DIN 10167) ; Il est cité dans le « Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual » (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html) des Etats-Unis d'Amérique et dans le « Health Canada Compendium of Analytical Methods » (www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_3/e_mflp9001.html). C'est également la méthode officielle retenue par le ministère de la santé du Japon.
- ii) Effectuer une IMS selon les instructions du fabricant, à partir des échantillons pré-enrichis, avec la méthode manuelle (MIMS) ou automatisée (AIMS). On prendra soin de bien mélanger les billes avant usage et d'éviter toute contamination croisée entre les tubes déjà préparés. Si l'on utilise la méthode manuelle, il est essentiel de bien respecter les instructions concernant le lavage soigneux des complexes billes-bactéries.
- iii) Après le dernier lavage, utiliser une micropipette pour transférer 50 µl de chaque complexe billes-bactéries sur une gélose MacConkey au sorbitol contenant de la céfixime et du tellurite de potassium (CT-SMAC) (35), en prenant soin d'éviter les contaminations croisées.
- iv) Avec un écouvillon stérile, étaler la goutte de 50 µl sur le tiers ou la moitié de la gélose de façon à briser les complexes. A l'aide d'une anse de platine stérile de 10 µl, étaler à nouveau les complexes billes-bactéries sur un quadrant de gélose, en traçant en surface des lignes partant à angle droit de l'étalement initial. Avec une seconde anse de platine stérile, tracer des lignes partant à angle droit du quadrant précédent et dirigées vers le dernier quadrant encore vierge de la gélose, de façon à obtenir des colonies isolées. Incuber à 37 °C ± 2 °C durant 16 à 18 h (après ce délai les colonies fermentant le sorbitol vont se décolorer, et pourraient être confondues avec des *E. coli* O157 ne fermentant pas le sorbitol). Une autre méthode pour isoler les colonies ne fermentant pas le sorbitol consiste à étaler tout l'inoculum à la surface d'une gélose CT-SMAC sèche avec une pipette boutonnée stérile.

c) Identification des colonies

- i) Prélever 10 colonies blanches « sorbitol-négatives » par gélose et les soumettre à l'épreuve de l'agglutination au latex O157 en suivant les instructions du fabricant (inclure les témoins appropriés : bactéries donnant une réaction positive ou négative et latex).
- ii) Repiquer les colonies agglutinables sur un milieu solide sans antibiotiques (par exemple une gélose au sang de mouton). Les étaler de façon à isoler de nouvelles colonies. Incuber une nuit à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

d) Confirmation de l'espèce *Escherichia coli*

- i) Inoculer un bouillon o-nitrophényl bêta-D-galactopyranoside. Placer des témoins positifs et négatifs. Incuber une nuit, en aérobiose à 37 °C . Les *Escherichia coli* donnent un résultat positif, reconnaissable à l'apparition d'une coloration jaune qui confirme l'activité de leur bêta-galactosidase.
- ii) À l'aide d'une pince stérile, déposer une rondelle de papier filtre en membrane de nitrate de cellulose de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ sur une boîte de gélose biliée tryptonée (TBA). En utilisant une anse de platine stérile de $1\text{ }\mu\text{l}$, prélever une anse du produit à analyser qui servira à inoculer une surface de la taille d'un petit pois sur un filtre Millipore. Placer des témoins positifs et négatifs. Incuber au moins 17 h à 44 °C . Transférer la membrane sur un papier filtre imprégné de réactif à l'indole permettant de détecter la dégradation du tryptophane. Les *Escherichia coli* présentent une réaction positive, reconnaissable à une coloration rose pourpre.
- iii) Il existe dans le commerce un réactif permettant la détection de l'indole. Ce réactif est déposé sur un papier filtre et on écrase sur la tache de réactif un morceau de la colonie suspecte. La réaction ne demande pas plus de 5 min et le résultat peut être confirmé par l'épreuve précédemment décrite si aucune réaction n'apparaît. Du milieu pour l'indole est aussi disponible dans le commerce.
- iv) On peut aussi employer des kits du commerce pour confirmer l'identification de l'espèce *E. coli*.

e) Détermination somatique (24)

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification décrite ci-dessus au point c) et la repiquer dans 4 ml de bouillon Schlecht (31). Incuber une nuit à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- ii) Porter le bouillon Schlecht à ébullition pendant au moins 1 h à 100 °C .
- iii) Répartir 25 μl d'une solution saline à 0,85 % dans les puits n°2 à 12 d'une plaque de microtitrage à fond en U. Déposer 50 μl de sérum anti O157 dans le puits n°1. Réaliser des dilutions de 2 en 2 de l'antisérum O157 jusqu'à la dilution 1/1 024, en écartant 25 μl après l'avoir bien mélangé. Ajouter 50 μl du bouillon qui avait été porté à ébullition dans les puits n°1 à 12. Remplacer leur couvercle sur les plaques pour prévenir toute évaporation et incuber 6 h à 37 °C . Examiner les plaques sur fond noir pour observer une agglutination éventuelle dans les puits.

f) Épreuve sur cellules Vero

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification des colonies décrite ci-dessus au point c) et la repiquer dans 4 ml de bouillon Mundell (26). Incuber une nuit à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- ii) Préparer des bouillons contenant des souches témoins ne produisant pas de toxine, de toxine thermolabile, de facteur cytotoxique nécrosant et de VT. Incuber une nuit à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- iii) Déposer des cellules Vero (Cellules de rein provenant des singes vert d'Afrique, référence ATCC CCL81), 24 h avant l'ensemencement, dans des plaques de microtitrage à fond plat : 200 μl d'une suspension à 2×10^5 cellules /ml dans chaque puits. Incuber 24 h à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans une étuve à 5 % de CO_2 ;
- iv) Ajouter, dans chaque bouillon de culture de la nuit, 100 μl d'une solution en eau distillée stérile de sulfate de polymyxine B à 400 000 unités/ml. Incuber 5 h à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- v) Centrifuger les bouillons à 3 000 tr/min pendant 30 min ;
- vi) Placer les surnageants dans des flacons stériles étiquetés (il faut environ 1,5 ml par flacon) ;
- vii) Placer les plaques de cellules Vero sur une feuille numérotée pour pouvoir identifier chacun des puits. Inoculer 10 μl du surnageant préparé dans le puits correspondant de cellules Vero. Remettre les cellules dans l'étuve à CO_2 et les y laisser 3 jours ;
- viii) Examiner les cellules après 24 h, 48 h, et 72 h, en recherchant tout effet cytopathogène éventuel. Comparer avec les témoins positifs et négatifs. Si des échantillons contiennent des VT, le tapis cellulaire sera détruit et des cellules noircies et rétractées seront visibles en 24 à 72 h.

g) PCR multiplex pour VT1, VT2 et eae (1, 15, 32)

La PCR multiplex est employée pour confirmer la présence éventuelle de marqueurs de virulence en utilisant les amorces de la façon suivante :

Gène cible	Accession n°	Séquence des amorces	Position des nucléotides	Taille de l'amplicon (pb)
VT1	M19437	F (5'-CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-3')	287–306	256
		R (5'-CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-3')	522–541	
VT2	X07865	F (5'-TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG-3')	623–642	185
		R (5'-GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC-3')	788–807	
eaeA	X60439	F (5'-GC-TTA-GTG-CTG-GTT-TAG-GAT-TG-3')	271–293	618
		R (5'-CCA-GTG-AAC-TAC-CGT-CAA-AG-3')	871–890	

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification des colonies décrite ci-dessus au point c et la repiquer dans 1 ml de bouillon Luria-Bertani. Prévoir 3 témoins appropriés. Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C ;
- ii) Porter les bouillons à ébullition 15 min à 100 °C. Les retirer du bain Marie et les laisser refroidir ;
- iii) Préparer la solution dans laquelle seront mélangés 48 µl de chacun des échantillons, contenant :
1× tampon Saiki (50 mM KCl ; 10 mM Tris, pH 8,5 ; 100 µg/ml de gélatine) ; 3 mM de MgCl₂ ; 0,5 U de Taq polymérase ; 25 pmoles de chaque amorce (sens et anti-sens pour VT1, VT2 et eaeA) ; 0,2 mM de chaque base nucléotidique dATP, dCTP, dGTP et dTTP.
- iv) Mélanger en retournant les tubes et distribuer 48 µl du mélange dans chaque tube de réaction PCR ;
- v) Déposer 2 µl de la culture précédemment portée à ébullition (extrait brut d'ADN) au fond de chaque tube réactif (ajouter 3 extraits témoins et témoin milieu) ;
- vi) Lancer la PCR en utilisant les paramètres d'un cycle de dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 min ; 25 cycles comprenant un étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une étape de dénaturation à 62 °C pendant 1,5 min et une étape d'élongation à 72 °C pendant 2 min ; avec une étape complémentaire finale de 72 °C pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à 4 °C jusqu'à ce qu'on en ait besoin pour l'électrophorèse ;
- vii) Soumettre 15 µl de chaque échantillon de PCR à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % en tampon E (10× une solution forte réalisée par addition successive dans de l'eau distillée de : 109 g/litre de Tris, 55,6 g/litre d'acide orthoborique, 9,3 g d'EDTA. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée ajustée à pH 8 avec 10 ml d'acide chlorhydrique dilué avant usage dans de l'eau distillée). Faire migrer une échelle de poids moléculaire de 100 pb comme référence.
- ix) Colorer au bromure d'éthidium et observer en lumière ultraviolette.
- x) Examiner les lignes témoins pour repérer la position de VT1, VT2 et des amplicons eae. Comparer avec les bandes présentes dans les lignes de l'échantillon. Enregistrer les résultats.

2. Épreuves sérologiques

Chez l'homme, le sérodiagnostic des VTEC peut être intéressant, particulièrement en phase tardive de la maladie lorsque l'agent causal devient de plus en plus difficile à isoler dans les fèces. Le LPS s'est avéré l'antigène de choix, et la production d'anticorps dirigé contre le LPS des très nombreux sérotypes existants de VTEC a été bien démontrée. Les épreuves sérologiques ne sont pas utilisées pour le diagnostic de l'infection animale par les VTEC. Néanmoins, il a été prouvé que l'exposition des bovins à une infection par *E. coli* O157:H7 était suivie de la production d'anticorps dirigés contre le LPS O157, et que ces anticorps persistaient pendant des mois, comme l'ont révélé des ELISA indirects (17). Des réactions croisées ont été constatées entre les LPS-O157 et les LPS d'autres bactéries, dont *E. coli* O55, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* et des souches de *Vibrio cholerae* non-O1. Afin de réduire le nombre de ces réactions croisées, un ELISA bloquant, produit avec un anticorps monoclonal compétiteur spécifique de *E. coli* O157, a été développé ; il permet de repérer, chez les bovins, les anticorps sériques dirigés contre l'antigène O 157 (20). Des anticorps sériques dirigés contre la VT1, mais pas contre la VT2, ont été observés chez les bovins lors d'épreuves de neutralisation de la toxine sur cellules Vero (17). D'autres études chez les bovins ont montré une plus grande prévalence d'anticorps neutralisant la VT1 que d'anticorps neutralisant la VT2, ce qui peut s'expliquer par une plus grande prévalence des VTEC producteurs de VT1 chez les bovins, et/ou par un moindre pouvoir antigénique des VT2.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas actuellement de vaccins permettant de prévenir les VTEC transmissibles à l'homme. Diverses approches vers un contrôle immunologique des infections à EHEC chez l'homme sont en cours de développement (23). Elles visent à prévenir la colonisation de l'intestin, les affections intestinales ou les graves séquelles du syndrome d'urémie hémolytique et du purpura thrombotique thrombocytopénique. Elles font appel à des vaccins conjugués (constitués d'un complexe entre le polysaccharide O157 et les sous-unités B de la VT1 et de la VT2 utilisées comme protéines porteuses), à des vaccins à vecteurs vivants, à des anatoxines ou à une immunisation passive par des globulines hyperimmunes ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la VT. Toutefois, si un vaccin efficace était découvert, il s'ouvrirait un débat au sujet des conséquences sociales, politiques et économiques d'une vaccination à grande échelle de l'homme contre des agents pathogènes qui se trouvent dans ses aliments. Etant donné que les animaux, notamment les bovins, sont considérés comme des réservoirs de l'infection pour l'homme, une nouvelle stratégie est actuellement envisagée qui consisterait à vacciner ces bovins de façon à réduire la colonisation de leur organisme par les VTEC et à réduire ainsi la contamination des aliments et de l'environnement (ce qui reviendrait à rendre les aliments plus sûrs, plutôt que de protéger les gens contre leurs aliments). Pour ce faire, l'une des approches consisterait à utiliser une souche vivante, atoxinogène et capable de coloniser l'organisme, comme vaccin administrable par voie orale et induisant des anticorps contre les composants de surface de la bactérie ; une autre possibilité envisagée serait d'administrer des facteurs favorisant la colonisation de l'organisme, tels que l'intimine, sous la forme d'un vaccin mangeable produit par des plantes transgéniques (12).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BEEBAKHEE G., LOUIE M., DE AZAVEDO J. & BRUNTON J. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 63–68.
2. BEKAL S., BROUSSEAU R., MASSON L., PREFONTAINE G., FAIRBROTHER J. & HAREL J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2113–2125.
3. BETTELHEIM K.A. (2000). Role of non-O157 VTEC. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 38S–50S.
4. BEUTIN L., GEIER D., STEINRUCK H., ZIMMERMANN S. & SCHEUTZ F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2483–2488.
5. BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. & GLEIER K. (2004). Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1099–1108.
6. BEUTIN L., MIKO A., KRAUSE G., PRIES K., HABY S., STEEGE K. & ALBRECHT N. (2007). Identification of human-pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of shiga toxin genes. *Appl. Env. Microbiol.*, **73**, 4769–4775.
7. BOER E. DE & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.
8. BLACKBURN C. DE W. & MCCARTHY J.D. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 285–290.
9. CHAPMAN P.A. & CUDJOE K.S. (2001). Evaluation of Bead retriever™, an automated system for concentration of *Escherichia coli* O157 from enrichment cultures by immunomagnetic separation. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, **9**, 203–214.
10. CHAPMAN P.A., WRIGHT D.J. & SIDONS C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 424–427.
11. CLIFTON-HADLEY F.A. (2000). Detection and diagnosis of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxigenic *E. coli* in animal faeces. *Rev. Med. Microbiol.*, **11**, 47–58.

12. GYLES C.L. (1998). Vaccines and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D. eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 434–444.
13. HOPKINS K.L. & HILTON A.C. (2000). Methods available for the sub-typing of *Escherichia coli* O157. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 741–748.
14. HULL A.E., ACHESON D.W.K., ECHEVERRIA P., DONOHUE-ROLFE A. & KEUSCH G.T. (1993). Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1167–1172.
15. JACKSON M.P., NEILL R.J., O'BRIEN A.D., HOLMES R.K. & NEWLAND J.W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 109–114.
16. JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A., SANDHU K.A., ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J.S. & GYLES C.L. (1996). Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **59**, 1112–1122.
17. JOHNSON R.P., CRAY W.C. & JOHNSON S.T. (1996). Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **64**, 1879–1883.
18. KARCH H. & BIELASZEWSKA M. (2001). Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H–strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2043–2049.
19. KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I. & STAVRIC S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775–779.
20. LAEGREID W., HOFFMAN M., KEEN J., ELDER R. & KWANG J. (1998). Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to O157 antigen of *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 242–246.
21. LAW D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 729–745.
22. LEE J.H. & CHOI S. (2006). Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microbes and Infection*, **8**, 2021–2026.
23. LEVINE M.M. (1998). Immunoprophylaxis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and disease: strengths and weaknesses of various strategies. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C. USA, 405–408.
24. MATTHEWS L., MCKENDRICK I.J., TERNENT H., GUNN G.J., SYNGE B. & WOOLHOUSE M.E.J. (2006). Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidem. Infect.*, **134**, 131–142.
25. MEYER-BROSETA S., BASTIAN S.N., ARNE P.D., CERF O. & SANAA M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 347–361.
26. MUNDELL D.H., ANSELMO C.R. & WISHNOW R.M. (1976). Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, **14**, 383–388.
27. NATARO J.P. & KAPER J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 142–201.
28. O'BRIEN A.D. & LAVECK G.D. (1983) Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* type 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**, 675–683.
29. PATON J.C. & PATON A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450–479.
30. RICE D.H., SHENG H.Q., WYNIA S.A. & HOVDE C.J. (2003). Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4924–4929.
31. RING K. & SCHLECHT S. (1970). Ein neuer laboratoriumsfermenter zur züchtung von mikroorganismen im turbidostatischen, chemostatischen und "batch" verfahren. II. Mitteilung. Arbeitsweise und anwendungsbeispiele. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde*, **213**, 103–119.

32. STROCKBINE N.A., JACKSON M.P., SUNG L.M., HOLMES R.K. & O'BRIEN A.D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.*, **170**, 1116–1122.
33. STROCKBINE N.A., WELLS J.G., BOPP C.A. & BARRETT T.J. (1998). Overview of detection and subtyping methods. *In: Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 331–356.
34. VERNZOY-ROZAND C. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 537–551.
35. ZADIK P.M., CHAPMAN P.A. & SIDDONS C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 155–158.
36. ZIEBELL K.A., READ S.C., JOHNSON R.P. & GYLES C.L. (2002). Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.*, **153**, 289–300.

*

* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour *Escherichia coli* vérocytotoxinogène (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel Terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int)