

64587

E610-GOU-R

Recherche des *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC) dont *E. coli* O157 : H7 dans l'environnement marin (coquillages)

Gourmelon M¹, Montet MP², Loaec S¹, Le Menec C¹, Pommeypuy M¹, Vernozy-Rozand C²
¹Ifremer, ²Ecole vétérinaire de Lyon

Juin 2003



Année 2002-2003

ART 5 : Microorganismes et environnement côtier

Programme National d'Océanographie Côtière, PNEC

Ifremer



IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL09666

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE / PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	2
2.1. PRESENTATION DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGENES DONT LES VTEC	2
2.2. LA CONTAMINATION PAR LES VTEC	2
2.3. DESCRIPTION DES FACTEURS DE VIRULENCE	4
2.3.1. <i>Les vérotoxines</i>	4
2.3.2. <i>Les autres facteurs de virulence</i>	4
3. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE	5
4. MATERIELS ET METHODES	6
4.1. SOUCHES UTILISEES DANS L'ETUDE	6
4.2. MISE AU POINT DU PROTOCOLE : OPTIMISATION DE LA PREPARATION DES ECHANTILLONS	6
4.2.1. <i>Recherche des E. coli O157 par leur caractère biochimique et immunologique</i>	6
4.2.2. <i>Recherche des gènes stx par PCR</i>	7
4.2.3. <i>Prélèvements des échantillons</i>	8
4.2.4. <i>Préparation des coquillages et des bouillons d'enrichissement</i>	9
4.2.5. <i>Isolement des E. coli O157 par IMS (ISO 16654)</i>	9
4.2.6. <i>Extraction des ADNs et réalisation des PCR stx sur les bouillons d'enrichissement</i>	9
4.2.7. <i>Isolement des VTEC à partir des bouillons d'enrichissement PCR stx positif</i>	11
4.2.8. <i>Séquencage des amplicons</i>	11
4.2.9. <i>Analyse Escherichia coli</i>	12
5. RESULTATS	13
5.1. MISE AU POINT DU PROTOCOLE PCR <i>STX</i> ET IMS/CULTURE SUR COQUILLAGES ARTIFICIELLEMENT CONTAMINES	13
5.1.1. <i>Recherche des VTEC par PCR stx</i>	13
5.1.2. <i>Recherche des E. coli O157 par IMS</i>	14
5.2. ANALYSE DES COQUILLAGES	14
5.2.1. <i>Recherche des E. coli O157 : H7</i>	14
5.2.2. <i>Recherche des VTEC par PCR</i>	15
5.3. CONTAMINATION EN <i>E. COLI</i> (TEMOIN DE CONTAMINATION FECALE) DES SITES DE PRELEVEMENT DES COQUILLAGES	17
5.3.1. <i>Coquillages analysés au cours de l'étude</i>	17
5.3.2. <i>Données en E. coli complémentaires sur les sites étudiés au cours de la période d'étude</i>	18
6. DISCUSSION	20
7. CONCLUSIONS	23
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	24
9. ABREVIATIONS	28
10. REMERCIEMENTS	29
ANNEXE	30

1. Introduction

La qualité sanitaire du milieu marin côtier est influencée par la présence de rejets urbains ou de rejets diffus d'origine agricole. Ces effluents sont riches en bactéries ou virus d'origine fécale, dont certains ont été mis en cause dans des pathologies humaines (Beeching, 1997 ; Feldhusen, 2000 ; Lipp et Rose, 1997 ; Yam *et al.*, 1999).

Parmi les microorganismes pouvant présenter un danger pour l'homme, certains, pathogènes émergents ces dernières années, n'ont été que récemment recherchés dans l'environnement : on peut citer les *Cryptosporidium* et les *Giardia* pour les parasites, les norovirus pour les virus et les *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC) pour les bactéries. Ces derniers ne sont connus que depuis 1982, date à laquelle *E. coli* O157 : H7 a été isolé pour la première fois dans des épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis liées à la consommation de hamburgers contaminés (Riley *et al.*, 1983). Les VTEC ont été depuis mis en cause dans plusieurs épidémies ou cas sporadiques au Canada, au Japon, en Afrique et en Europe... (Chalmers *et al.*, 2000 ; Haeghebaert *et al.*, 2001b ; Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

La contamination de l'environnement par les VTEC peut éventuellement conduire à un risque pour la santé humaine ; en effet, des infections à VTEC ont été reportées suite à la contamination d'aliments ou d'eaux ou suite à la pratique d'activités récréatives telles que les baignades dans des eaux contaminées. Le littoral en tant que réceptacle des effluents urbains et agricoles pourrait héberger de telles bactéries dans les zones particulièrement exposées. L'homme pourrait alors être infecté lors de la consommation de coquillages consommés crus ou lors de baignades dans des eaux marines de mauvaise qualité. A notre connaissance, cette implication de l'eau de mer et des coquillages n'a jamais été mise en évidence en France. L'originalité de ce projet est de rechercher si ces bactéries peuvent être présentes dans l'environnement marin en développant ou adaptant des méthodes de détection. La présence de ces bactéries pourrait peut-être expliquer certaines TIACs (toxi-infections alimentaires collectives) liées à la consommation de coquillages dont l'agent responsable n'a pas été identifié.

2. Le contexte scientifique / partie bibliographique

2.1. Présentation des *Escherichia coli* pathogènes dont les VTEC

Les *Escherichia coli* font partie de la flore habituelle du tube digestif de l'homme et des animaux, cependant certaines souches possédant des facteurs de pathogénicité peuvent être à l'origine de pathologies intestinales mais également extra-digestives (Grimont, 1998). Ces facteurs sont essentiellement des toxines pour les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des composés permettant l'invasion pour les entéroinvasifs (EIEC), des facteurs permettant l'attachement aux parois intestinales pour les entéro-pathogènes (EPEC) et à la fois des toxines et des facteurs d'attachement pour les entérohémorragiques (EHEC). Parmi ces derniers, la souche *E. coli* O157 : H7, la plus fréquemment rencontrée dans les pathologies, proviendrait d'une souche entéro-pathogène O55 : H7, impliquée dans des diarrhées chez l'enfant. Cette souche aurait été lysogénéisée par des phages possédant les gènes *stx1* ou *stx2* qui codent pour des vérotoxines et dénommées ainsi en raison de leur capacité à tuer *in vitro* les cellules Vero, cellules de rein de singe (Feng *et al.*, 1998).

Les EHEC présentent le caractère pathogène le plus important et peuvent conduire à des pathologies sévères, digestives (simples diarrhées ou colites hémorragiques) ou extra-digestives (syndrome hémolytique et urémique, SHU avec 3 à 5 % de mortalité chez le jeune enfant et purpura thrombotique thrombocytopénique, PTT). Les complications rénales sont particulièrement observées chez les jeunes enfants et les personnes âgées. Lors de la mise en évidence de telles pathologies, *E. coli* O157 : H7 est le plus souvent isolé : en France, par exemple, le séro-groupe O157 a été mis en évidence dans 50 % des cas de SHU étudiés de 1993-1999 ; Haeghebaert *et al.*, 2001b). Les autres souches non O157 pouvant être rencontrées dans ce type de pathologie sont principalement les *E. coli* O103, O26 et O111 (Bettelheim, 2000 ; Haeghebaert *et al.*, 2001b ; Hiramatsu *et al.*, 2002).

Parmi les VTEC ou *E. coli* O157 : H7, des différences importantes dans le caractère pathogène des souches sont observées selon la nature et le nombre de gènes de virulence qu'elles possèdent. En général, les bactéries isolées dans les selles de malades vont avoir la majorité ou l'ensemble des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA* codant respectivement pour les vérotoxines 1 et 2, l'intimine, protéine de la membrane externe intervenant dans l'attachement aux cellules intestinales, et l'entérohémolysine. Par contre dans les aliments, chez les animaux ou dans l'environnement, une partie des souches ne possède que certains des gènes et de ce fait sont le plus souvent moins pathogènes. Ainsi, des souches d'*E. coli* O157 : H7 ne possédant pas les gènes des vérotoxines ont été mis en évidence dans des selles de génisse (2 sur les 3 souches isolées à partir de 300 échantillons ; Vernozzy-Rozand *et al.*, 2000).

2.2. La contamination par les VTEC

Une contamination de l'homme par les VTEC se fait principalement par ingestion d'une faible quantité de bactéries (la dose infectieuse est inférieure à 100 bactéries). Plusieurs voies de contamination existent : principalement l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminés : viandes de bœuf insuffisamment cuites, produits laitiers au lait cru, ou autres aliments et eaux souillés par des déjections animales (Cody *et al.*, 1999 ; Michino *et al.*, 1999 ; Ogden *et al.*, 2001 ; Tulle *et al.*, 1999). En France, par exemple, une toxi-infection

alimentaire (TIAC) à une souche VTEC *E. coli* 148 survenue en 2002 a été attribuée à la consommation de viande de mouton (Espié *et al.*, 2003). Des contaminations directes par contact avec des malades ou des animaux contaminés ont été également observées (Boudaillez *et al.*, 1997 ; Chalmers *et al.*, 2000). Des cas de contamination au cours de baignade dans des eaux douces ont été reportés (Ackman *et al.*, 1997 ; Chalmers *et al.*, 2000 ; Paunio *et al.*, 1999).

Les ruminants et tout particulièrement les bovins sont les principaux réservoirs (Hancock *et al.*, 2001 ; Le jeune *et al.*, 2001). Les VTEC peuvent être isolés d'animaux malades ou d'animaux sains (Enriquez *et al.*, 2001). Le portage sain est généralement transitoire (inférieur à un mois) mais à l'échelle du troupeau l'excrétion peut durer plusieurs années (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). L'excrétion des *E. coli* O157 : H7 par des bovins a été évaluée et des pourcentages d'excrétion variant de 0,3 à 7 % ont été obtenus (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). Dans le cas d'animaux malades, les VTEC non O157 seraient plutôt impliqués. La présence chez d'autres animaux (moutons, porcs, animaux familiers : Beutin *et al.*, 1993 ; Cornick *et al.*, 2000 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000) ou chez des oiseaux (oiseaux marins, pigeons : Makino *et al.*, 2000 ; Schmidt *et al.*, 2000 ; Wallace *et al.*, 1997) a également été signalée.

Il est actuellement difficile d'avoir une idée précise de l'importance des infections à VTEC dans le monde. En raison de l'incapacité de nombreux laboratoires à rechercher les *E. coli* O157 : H7 et autres VTEC, le nombre de cas déclarés sous-estime l'importance des infections dues aux *E. coli* vérotoxiques. Aux Etats-Unis, les infections à *E. coli* O157 pourraient conduire à 73 500 cas de maladies, 2000 hospitalisations et 60 morts par an (Mead *et al.*, 1999). De 1982 à 2000, dans ce même pays, *E. coli* O157 a été identifié comme agent responsable de 283 cas d'infections (pour chaque cas retenu, au moins deux personnes devaient être contaminées par la même source) ayant conduit à la contamination de 8466 personnes, à 1276 (15 %) hospitalisations, à 294 (3 %) SHU et à 36 (0,4 %) décès (Griffin *et al.*, 2003 ; données recueillies par le CDC, Atlanta). En France, la recherche des VTEC n'est réalisée que lors d'épisodes de SHU (pas de recherche en routine dans les selles de malades) ; on ne dispose donc pas du nombre de cas d'infections à VTEC hors SHU.

Depuis 1996, l'institut de veille sanitaire a mis en place un système de surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez l'enfant de moins de 15 ans. Ce réseau a ainsi permis de montrer que l'incidence des SHU était supérieure en Bretagne (1,4 / 100 000 ; 63 cas de 1993 à 2000) à celle des autres régions françaises (moyenne 0,8 / 100 000) et avec la moitié de ces cas dans le seul département du Finistère (Haeghebaert *et al.*, 2001a). Ce département se caractérise par une activité agricole importante d'élevage et de cultures. Une transmission des bactéries de l'animal ou de l'environnement à l'homme serait possible (Haeghebaert *et al.*, 2001a). Des études ont abordé la recherche de ces bactéries dans l'environnement (sols épandus par les déjections animales, eaux douces ou marines sous influence de rejets agricoles ou coquillages élevés en aval d'un bassin agricole ; Conedera *et al.*, 2001 ; Fenlon *et al.*, 2000 ; Dupray *et al.*, 1999 ; Lejeune *et al.*, 2001 ; Miyagi *et al.*, 2001). Les travaux dont on dispose sur le sujet ont montré que ces bactéries survivaient suffisamment longtemps dans l'environnement pour être éventuellement retrouvées dans le milieu marin soumis à des apports d'origine agricole. En effet, des travaux ont montré que *E. coli* O157 : H7 survivait jusqu'à 38 semaines dans du fumier (Randall *et al.*, 1999).

2.3. Description des facteurs de virulence

2.3.1. Les vérotoxines

Les vérotoxines (ou Shiga-like toxines) (Stx1 ou Stx2) sont les principaux facteurs de virulence des VTEC. Les toxines Stx1 et Stx2 possèdent des activités biologiques proches (dont la cytotoxicité pour les cellules Vero et Hela *in vitro*) mais sont différentes sur le plan immunologique ; elles possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie, au niveau de la séquence protéique, avec la toxine de *Shigella dysenteriae*. Il existe peu de variants de STX1 et plus de 20 variants de Stx2 décrits dans la littérature ou la banque de données GenBank (Nakao *et al*, 2002). La vérotoxine Stx2 est 1000 fois plus cytotoxique que Stx1 et est donc plus souvent retrouvée en pathologie humaine. Les gènes de structure codant pour ces vérotoxines sont localisés au niveau du génome de bactériophages convertisseurs : les souches lysogénéisées par ces phages acquièrent la capacité de produire la toxine correspondante. Les gènes sont composés d'une sous-unité A et d'une sous-unité B organisés en un seul opéron d'environ 1230 paires de bases codant pour les deux parties de la vérotoxine. La sous-unité A (32 kDa) de la toxine est responsable de l'activité enzymatique (activité de type N-glycosidase qui agit au niveau de l'adénine 2348 de l'ARN 28S du ribosome de la cellule eucaryote). La toxine est également constituée de cinq sous-unités B (7,7 kDa) qui permettent la fixation au niveau d'un récepteur cellulaire, un glycolipide membranaire appelé globotriosylcéramide (Gb3). Les cellules riches en Gb3 sont ainsi les principales cibles de cette toxine : cellules endothéliales au niveau colique, rénal et du système nerveux central. Certains variants Stx2 (par exemple, Stx2e) se fixent plutôt sur les globotétrasylicéramides (Gb4). Une fois fixée sur le récepteur membranaire, la molécule toxique est internalisée. La sous-unité A inhibe l'élongation de la chaîne peptidique durant la synthèse protéique, conduisant ainsi à la mort des cellules eucaryotes.

2.3.2. Les autres facteurs de virulence

Parmi les autres facteurs de virulence, on peut citer :

- les facteurs d'attachement et d'effacement aux microvillosités intestinales

Le gène *eae* porté par le locus chromosomique LEE (locus d'effacement de *E. coli*) code pour une protéine de la membrane externe (intimine) impliquée dans l'adhésion étroite aux entérocytes qui conduit à une accumulation de microfilaments d'actine plus ou moins dépolymérisés aux zones de contact cellules-bactéries causant des lésions d'attachement et d'effacement dans la muqueuse intestinale. Le gène *eae* est plus fréquemment retrouvé chez les souches *E. coli* O157 : H7 que les autres *E. coli* non O157, et tout particulièrement dans les souches isolées en pathologie humaine.

- les entérohémolysines

L'entérohémolysine (EHX ou E-Hly) est codée par le gène *ehxA* et est douée d'une activité hémolytique. Son rôle précis en pathologie n'est pas encore bien connu.

3. Les objectifs de l'étude

L'objectif général de cette étude était d'évaluer la présence de bactéries pathogènes émergentes, les *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC), entre autres *E. coli* O157 : H7, dans le milieu marin (coquillages). Le choix de rechercher les VTEC en plus d'*E. coli* O157 a été retenu pour mettre en évidence les VTEC non O157 et les *E. coli* O157 non vérotoxiques.

Après avoir déterminé le protocole le plus adapté pour rechercher ces bactéries dans des échantillons de l'environnement, les VTEC et les *E. coli* O157 : H7 ont été recherchés dans des coquillages contaminés naturellement. Des coquillages ont été prélevés en septembre-octobre 2002, en janvier-février 2003 et en avril-mai 2003 dans 6 zones conchylicoles françaises classées en B (voir en annexe classification des zones conchylicoles) réparties sur les différentes façades maritimes. Par ailleurs, nous avons implanté des coquillages dans une zone interdite à la conchyliculture (en aval d'une station d'épuration et de zones à activités agricoles) de façon à avoir, si possible, un témoin positif (site susceptible d'être contaminé de façon importante par des bactéries d'origine fécale).

4. Matériels et méthodes

4.1. Souches utilisées dans l'étude

Une souche *E. coli* O157 : H7 non vérotoxique (EC261) et une souche vérotoxique non O157 (EVL 02.1) ont été utilisées respectivement pour contaminer artificiellement des chairs de coquillage lors de l'optimisation du protocole de recherche des *E. coli* O157 et lors de l'optimisation du protocole de détection des gènes *stx* par PCR. Des extraits d'ADNs de plusieurs souches décrites dans le tableau 1 ont été utilisés comme extraits témoins lors des PCR.

Bactérie	Souche	Sérotype	Génotype						Origine	Référence
			<i>stx</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2e</i>	<i>eae</i>	<i>ehx</i>		
<i>E. coli</i>	EC 261	O157 :H7	-	-	-	-	+	+	Faeces de bovin	Vernozy-Rozand <i>et al</i> , 2000
<i>E. coli</i>	EVL.02.1		+	-	+	+	-	-		
<i>E. coli</i>	376, D-A		+	+	-	-	-	-	fromage	
<i>E. coli</i>	IFRA		+	+	-	-	-	-	moule	cette étude
<i>E. coli</i>	IFRB		+	-	-	-	-	+	moule	cette étude

Tableau 1 : Souches utilisées ou isolées au cours de cette étude.

4.2. Mise au point du protocole : optimisation de la préparation des échantillons

Au cours de cette étude, les *E. coli* vérotoxiques ont été recherchés de deux façons :

- recherche des *E. coli* O157 : H7 par leurs propriétés biochimiques et immunologiques.
- recherche des gènes *stx* codant pour les vérotoxines par PCR dans les bouillons d'enrichissement.

4.2.1. Recherche des *E. coli* O157 par leur caractère biochimique et immunologique

Une étape d'immunoséparation magnétique avec des billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps O157 (Dynal) a été réalisée afin de concentrer les *E. coli* O157 à partir des bouillons d'enrichissement.

Pour limiter les interférences par les débris et autres bactéries lors de l'IMS, des essais ont été conduits avec des CLI artificiellement contaminés par une souche *E. coli* O157 : H7 (EC 261 ; bactéries prélevées en phase stationnaire après 18 h de culture à 37°C en bouillon TD sous agitation ; la concentration finale en bactéries du bouillon étant $7,4 \cdot 10^8$ /ml). L'équivalent de 25 g de CLI broyés a été dilué au 1/10 dans de l'EPT en présence de la souche ou non. Ainsi, trois enrichissements ont été réalisés :

- un enrichissement témoin, sans apport d'*E. coli* O157,
- un enrichissement avec un apport initial de 7,4 UFC d'*E. coli* O157 / 100 g de CLI,
- un enrichissement avec un apport initial de 745 UFC/ 100 g de CLI.

Après une incubation de 6 h à 37°C, les surnageants des bouillons d'enrichissement ont été prélevés, 1) directement, 2) après centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes ou 3) après filtration sur 8 µm et 0,22 µm. Dans ce dernier cas, les bouillons d'enrichissement ont, tout d'abord, été filtrés sur 8 µm pour éliminer les plus gros débris puis les filtrats sur 0,22 µm. Les bactéries retenues sur ce dernier filtre ont été remises ensuite en suspension dans un volume équivalent de PBS. Un millilitre de bouillon d'enrichissement a été mis en contact de billes anti-*E. coli* O157 pendant 30 minutes sous agitation douce. Les complexes bactéries-billes ont été récupérés à l'aide d'un aimant, lavés trois fois par du tampon phosphate salé, PBS-Tween 0,05 %, puis repris dans 100 µl du même tampon. Ils ont ensuite été étalés sur géloses CT-SMAC et O157 : H7 ID (BioMérieux) par la technique d'isolement par épuisement. Les géloses sont ensuite incubées 24 h à 37°C. Les colonies caractéristiques ont été confirmées comme étant ou non des *E. coli* et possédant ou non l'antigène O157 (test au latex, Oxoid).

4.2.2. Recherche des gènes *stx* par PCR

Le choix s'est porté sur la recherche d'une partie conservée du gène *stx* (sous-unité A) en utilisant des amorces dégénérées (Read *et al.*, 1992) qui permet de mettre en évidence la majorité des gènes *stx*. Ce choix se justifie par le fait que seul le gène *stx2ev*, rencontré une seule fois, dans une souche isolée avant 1977, n'est pas mis en évidence parmi les gènes *stx* testés dans l'étude de Bastian *et al.* (1998). La PCR avec ces amorces dégénérées a été précédemment utilisée sur d'autres matrices ou échantillons de l'environnement (Bouvet *et al.*, 2001 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

Les premiers essais réalisés au laboratoire sur des eaux (eaux en sortie de station d'épuration ou effluent d'origine agricole) et sur des coquillages (huîtres) avaient montré que des inhibiteurs de PCR étaient présents dans ces échantillons naturels (inhibition de la PCR même pour des extraits d'ADN dilués au 1/100 ; résultats non montrés). Des essais ont donc été conduits afin de définir un protocole permettant de diminuer l'inhibition lors de l'analyse des coquillages.

La méthode a été mise au point sur des coquillages artificiellement contaminés. Dans un premier temps, des chairs et liquides intervalvaires (CLI) de coquillages commercialisés ont été broyés puis contaminés artificiellement par une souche *E. coli stx2e* (EVL.02.1). Les bactéries étaient en phase stationnaire : 18 h de culture à 37°C en bouillon trypticase soja (TD) sous agitation ; concentration finale en bactéries 3,8 10⁹ UFC /ml (UFC : unité formant colonie). L'équivalent de 25 g de CLI broyés a été dilué au 1/10 dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT) en présence ou non de la souche. Trois bouillons d'enrichissement sont ainsi obtenus :

- un enrichissement témoin, sans apport d'*E. coli* portant le gène *stx*,
- un enrichissement avec un apport initial de 3,8 10³ UFC d'*E. coli stx* positif / 100 g de CLI,
- un enrichissement avec un apport initial de 3,8 10⁶ UFC/ 100 g de CLI.

Après une incubation de 24 h à 37°C, les phases supérieures des bouillons d'enrichissement ont été prélevées, 1) soit directement, 2) soit après passage à travers le

filtre d'un sac stomacher, 3) soit après centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes ou enfin 4) soit après filtration sur membranes de 8 μm et de 0,22 μm . Les ADN ont ensuite été extraits et les gènes *stx* recherchés par PCR (voir ci-dessous 4.2.7, la description des conditions d'extraction des ADN et de PCR).

4.2.3. Prélèvements des échantillons

Sept sites de prélèvement de coquillages ont été sélectionnés sur les différentes façades maritimes françaises (figure 1) ; chaque site ayant été analysé au minimum à trois reprises.

Les coquillages ont été prélevés soit par les laboratoires côtiers (réseau REMI, Ifremer) pour les échantillons : 1, 2, 3, 5 et 6, soit par le laboratoire de microbiologie (DEL/MIC, Ifremer) pour les échantillons 4 et 7. Les coquillages étaient issus de zones conchylicoles classées en B sauf pour le point 7, zone interdite à la conchyliculture (coquillages implantés en sortie de station d'épuration et en aval de zones agricoles et donc susceptibles d'être contaminé de façon importante par des bactéries d'origine fécale).

Les coquillages analysés étaient des huîtres (*Crassostrea gigas*) pour les points : 3, 4, 7 et des moules : *Mytilus galloprovincialis* pour le point 6 et *Mytilus edulis* pour les échantillons 1, 2, 5.

Les coquillages prélevés ont été acheminés au laboratoire de microbiologie à Brest le plus rapidement possible en glacière réfrigérée ; les analyses ont été réalisées dans les 48 heures suivant le prélèvement.

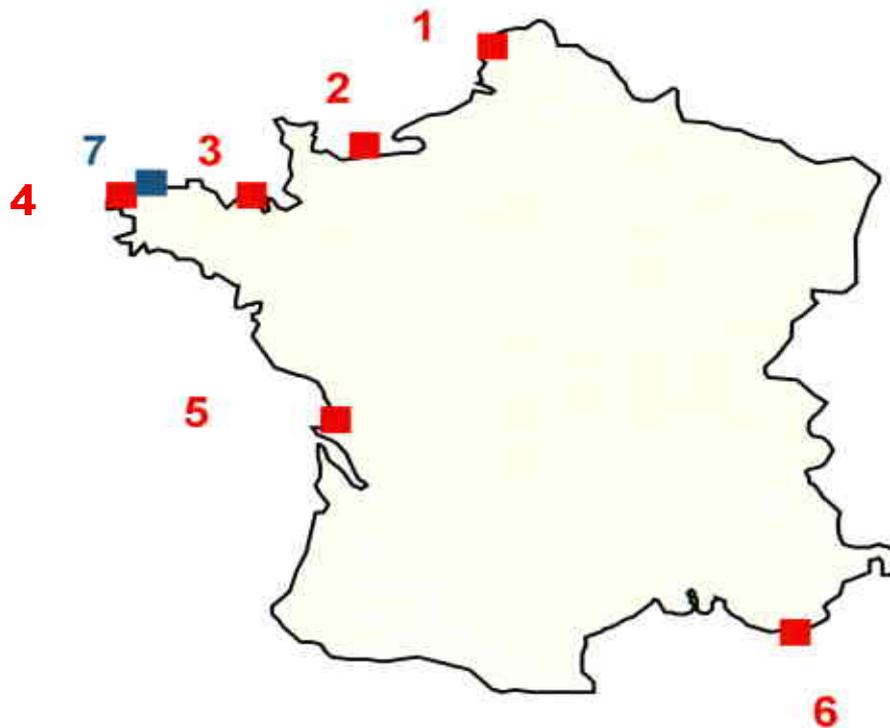


Figure 1 : Localisation des points de prélèvements de coquillages ; 1, 2, 3, 4, 5, 6 : zones conchylicoles classées en B ; 7 : en aval d'une station d'épuration.

4.2.4. Préparation des coquillages et des bouillons d'enrichissement

Les coquillages ont été ouverts après lavage des coquilles. Les chairs et liquides intervalvaires obtenus ont été prélevés et broyés directement pour une analyse sur les chairs totales ou disséqués pour une analyse sur les hépato-pancréas.

Les coquillages concentrant principalement les bactéries et les virus au niveau de ces glandes digestives, une analyse de ces organes permet de diminuer le seuil de détection et la concentration des inhibiteurs pouvant interférer lors des réactions de PCR (Hervio-Heath *et al.*, 2002 ; Le Guyader *et al.*, 2000).

Les CLI ont été broyés au Waring Blender 3 fois pendant 30 s après dilution au 1/2 ou au 1/3 dans de l'eau peptonée tamponnée. L'équivalent de 25 g de CLI a ensuite été dilué au 1/10 dans de l'EPT et incubé à 37 °C pendant 6 h (recherche des *E. coli* O157) ou 24 heures (recherche des VTEC).

Les hépato-pancréas (Hp) obtenus par dissection des chairs de coquillages ont été broyés au Polytron 3 fois 20 s et un enrichissement a été réalisé à partir de chaque lot de coquillages (le poids des hépato-pancréas peut varier, selon la période de l'année, de 3 à 10 % du poids des chairs et liquides intervalvaires des coquillages ; résultats observés au cours de cette étude). Les broyats ont été dilués en EPT (équivalent de 2 fois 5 g d'hépatopancréas dans 2 fois 45 ml d'EPT) et incubés 6 ou 24 heures à 37 °C.

4.2.5. Isolement des *E. coli* O157 par IMS (ISO 16654)

Après 6 heures d'incubation à 37 °C, un millilitre de l'enrichissement (CLI et Hp) a été mis au contact de billes recouvertes d'anticorps O157, soit directement, soit après une étape de filtration (voir précédemment 4.2.2). Après 3 lavages dans du PBS-tween 0,05 %, les bactéries concentrées sur les billes ont été isolées sur milieux spécifiques (CT-SMAC, *E. coli* O157 : H7 ID et pour les échantillons susceptibles d'être fortement contaminés en *E. coli*, CT-*E. coli* O157 : H7 ID, BioMérieux). Après une incubation de 20 à 24 h à 37°C, les colonies caractéristiques ont été repiquées sur gélose TBX ou TD. La présence ou non de l'antigène O157 est confirmée par un test d'agglutination au latex antiO157 (Oxoid) et l'identité des colonies, *Escherichia coli* ou non, a été déterminée biochimiquement par galerie API 20E (BioMérieux).

4.2.6. Extraction des ADNs et réalisation des PCR *stx* sur les bouillons d'enrichissement

Les acides nucléiques ont été extraits après lavages des bactéries (2 par du PBS-tween 2 % et 3 par du PBS - centrifugation à 12 000 g pendant 3 minutes). Les culots bactériens ont été repris dans 400 µl de résine Instagène (BioRad) pour les échantillons analysés directement et dans 100 µl pour les échantillons filtrés. Les bactéries ont été lysées par chauffage à 56°C pendant 30 minutes puis à 100°C pendant 15 minutes ; les ADNs ont été ensuite prélevés dans les surnageants obtenus après centrifugation de la solution lysée (12 000 g, à 4°C pendant 10 minutes). Les extraits sont conservés à - 80°C.

La présence des gènes *stx* a été recherchée par amplification génique (PCR) d'une partie conservée des gènes de vérotoxines en utilisant des amorces dégénérées selon la technique de Read *et al.* (1992). Un fragment de 323 pb du gène *stx* codant pour la sous-unité A des vérotoxines STX1, STX2 et variants STX2 est ainsi mis en évidence.

Dix microlitres d'extrait d'ADNs ont été ajoutés au mélange réactionnel contenant 5 µl de tampon 10 X (fourni avec l'enzyme ; Tris-HCl 100 mmol l⁻¹, MgCl₂ 15 mmol l⁻¹ ; KCl 500 mmol l⁻¹, pH 8.3 ; Roche Diagnostics, Meylan, France), 200 µmol l⁻¹ de chaque 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, 1,6 µmol l⁻¹ de chaque amorce et 1 U de Taq Polymerase (Roche Diagnostics) pour un volume final de 50 µl. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur Peltier Thermal Cycler (PTC 200 ; MJ Research, Waltham, MA, Etats-Unis) au cours de 40 cycles. Après une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 40 cycles constitués d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, d'une étape d'hybridation à 49°C pendant 30 s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s ont été effectués. Une élongation finale de 7 minutes à 72°C a été réalisée après le dernier cycle. Les produits de PCR (10 µl) ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (BET).

Amorces	Séquences (5' → 3')	Gène	Taille des amplicons (pb)	Référence
ES149	CGAAATYCYCTCTGTATYTGTC	<i>stx</i>	323	Read <i>et al.</i> , 1992
ES151	GARCRAAATAATTTATATGT			
LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	<i>stx1</i>	348	Cebula <i>et al.</i> , 1995
LP31	CACCAGCAATGTAACCGCTG			
LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	<i>stx2</i>	584	Cebula <i>et al.</i> , 1995
LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC			
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	<i>ehx</i>	534	Paton et Paton, 1998
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
eae P1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	<i>eae</i>	917	Reid <i>et al.</i> , 1999
eae P2	CCAGACGATACGATCCAG			

Tableau 2 : Description des amorces utilisées pour la recherche de l'ensemble des gènes *stx*, des gènes *stx1* et *stx2*, des gènes *ehx* et *eae*. Dans le cas des amorces dégénérées, Y correspond à un T ou un C et R à A ou un G.

Dans les extraits d'ADNs PCR *stx* positifs, les gènes *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx* ont été recherchés selon une adaptation des techniques de Cebula *et al.* (1995), Reid *et al.* (1999) et Paton et Paton (1998). La PCR selon Cebula *et al.* (1995) permet d'amplifier un fragment de 348 pb de la sous-unité A du gène *stx1* avec les amorces LP30 et LP31 et un fragment de 584 pb de la sous-unité A du gène *stx2* avec les amorces LP43 et LP44. La recherche des gènes *stx1* et des gènes *stx2* a été réalisée séparément (et non par PCR multiplex comme cela était décrit dans cette publication). Le gène *stx* codant pour la toxine de *Shigella dysenteriae* est mis également en évidence par la PCR *stx1*. La détection du gène *ehx* (*hly*) codant pour l'entérohémolysine a été réalisée avec les amorces hlyAF et hlyAR de Paton et Paton (1998) par amplification d'un fragment de 534 pb de ce gène ; celle du gène *eae* a été conduite avec les amorces *eae* P1 et *eae* P2 décrites par Reid *et al.* (1999) par amplification d'un fragment de 917 pb (Tableau 2).

4.2.7. Isolement des VTEC à partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positif

La recherche des souches et leur caractérisation ont été réalisées à l'unité de microbiologie alimentaire (EVL) à partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs. Les colonies de bactéries *stx* positives ont été identifiées par hybridation sur membrane. Les souches ont été ensuite caractérisées.

4.2.7.1. Description des sondes

Une souche *E. coli* O157 : H7 possédant le gène *stx1* et le gène *stx2* a été utilisée pour préparer la sonde *stx*.

L'ADN de cette souche a été extrait par la méthode phénol-chloroforme et une PCR utilisant les amorces *stx* a été réalisée. Les amplifiats ont été séparés et excisés d'un gel d'agarose à 2 %, puis purifiés avec utilisation du kit NucleoBond (740590.10, Macherey-Nagel, Allemagne). Le marquage à la digoxigénine a été réalisé en prenant le kit DIG-High-Prime (1585 606, Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne).

4.2.7.2. Hybridation sur colonie

Les échantillons enrichis ayant donné un message *stx* positif par PCR ont été traités de la manière suivante :

Cent microlitres d'une dilution 10^{-4} et 10^{-5} des échantillons enrichis ont été ensemencés sur gélose MacConkey (51015, BioMérieux, France). Après une incubation à 37°C, la dilution présentant le plus grand nombre de colonies isolées a été retenue pour la phase d'hybridation et la boîte d'isolement refroidie à 4°C pendant 30 minutes. La pré-hybridation a été réalisée en utilisant 10 ml d'une solution (5 X SSC, réactif de blocage, 1,5 % (p/v), N-lauroylsarcosine, 0,1% (p/v), SDS, 0,02 % (p/v)) à 60°C pendant 2 heures. L'hybridation a été conduite pendant 18 à 20 h à 60°C avec 5 ml d'une solution d'hybridation contenant 100 ng des sondes labellisées fraîchement dénaturées. Les membranes ont été lavées 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon (2 X SSC, SDS, 0,1 % (p/v)) à la température du laboratoire puis 2 fois pendant 20 minutes dans un tampon (0,1 X SSC, SDS, 0,1% (p/v)) à 60°C. La détection immunologique a été réalisée conformément aux instructions du fabricant (DIG-High Prime, Boehringer).

4.2.7.3. Identification et caractérisation des souches

L'identification de l'espèce *E. coli* a été réalisée en utilisant les galeries API 20E (BioMérieux).

Le sérotypage des souches isolées a été réalisé en utilisant le sérum d'agglutination (ref cof : 0157332, Sanofi Pasteur, France) pour les sérogroupes O55, O26, O111. Le test d'agglutination au latex (*E. coli* O157 Test Kit Oxoid) a permis la recherche du séro groupe O157.

La présence des gènes de virulence *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx* a été recherchée chez les souches isolées (Cebula *et al.*, 1995 ; Paton et Paton, 1998 ; Reid *et al.*, 1999).

4.2.8. Séquencage des amplicons

Les produits PCR *stx* positifs ont été amplifiés et poolés afin de déterminer les séquences des régions amplifiées. Les produits PCR obtenus ont été ensuite déposés sur gel d'agarose à 2 % (agarose à faible point de fusion ; agarose low-melting, Nusieve GTG agarose,

BMA, Rockland, Etats-Unis). Après 1 h 30 de migration à 110 V, les bandes correspondant aux fragments de 323 pb ont été découpées et purifiées sur colonne (Qiaquick gel extraction, Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur. Le séquençage des ADNs a été réalisé par un séquenceur automatisé selon une adaptation de la méthode de Sanger avec un marquage fluorescent de l'ADN (Genome Express, Grenoble, France).

4.2.9. Analyse *Escherichia coli*

Parallèlement aux recherches de VTEC, une analyse de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli* a été réalisée par la technique NPP en tubes (norme ISO 7251 ; points 4, 5 et 7) ou par la méthode par impédancemétrie (Malthus, norme Afnor V08-106 ; points 1, 2, 3, 6). Ces analyses ont été réalisées par les laboratoires côtiers de l'Ifremer.

5. Résultats

5.1. Mise au point du protocole PCR *stx* et IMS/culture sur coquillages artificiellement contaminés

5.1.1. Recherche des VTEC par PCR *stx*

La recherche des gènes *stx* par PCR à partir des échantillons de CLI dopés par une souche possédant un gène *stx* (EVL.02.1) a conduit aux résultats suivants (figure 2) :

- absence de détection du gène *stx* par PCR sur les bouillons d'enrichissement analysés directement ou après un simple passage à travers le filtre d'un sac stomacher. Ces extraits d'ADNs dopés par de l'ADN de souche *stx* positive se sont révélés également négatifs (extraits non dilués à dilués au 1/100) ; ces résultats sont en faveur d'une inhibition de la PCR par des composés présents dans les extraits d'ADNs.

- détection du gène *stx* par PCR sur les bouillons d'enrichissement après les étapes de filtration ou de centrifugation pour tous les échantillons dopés (contamination des coquillages : $3,8 \cdot 10^3$ et $3,8 \cdot 10^6$ / 100 g de CLI) ; pour la centrifugation, une légère inhibition (signal plus faible) est toutefois observée dans le cas des échantillons non dilués.

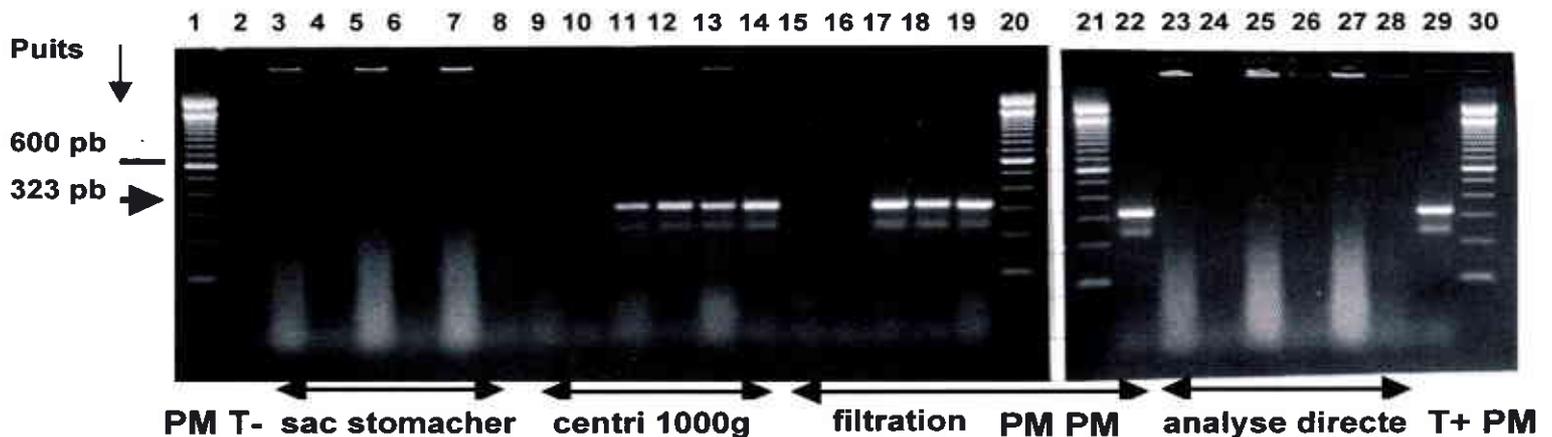


Figure 2 : Influence de la préparation des bouillons d'enrichissement sur les résultats obtenus par PCR.

Pistes 1, 20, 21 et 30 : PM, marqueurs de poids moléculaire (100 bp DNA ladder) ; piste 2 : témoin négatif ; pistes 3 à 8 : PCR à partir des bouillons d'enrichissement passés à travers le filtre d'un sac stomacher ; pistes 9 à 14 : PCR à partir des surnageants obtenus après centrifugation des bouillons à 1000 g pendant 2 minutes ; pistes 15 à 19 et 22 : PCR à partir des bouillons filtrés sur 8 et $0,22 \mu\text{m}$; pistes 23 à 28 : PCR à partir des bouillons analysés directement ; piste 29 : témoin positif.

Pistes 3 et 4, 9 et 10, 15 et 16, 23 et 24 : CLI sans apport de *E. coli*, extraits non dilués (ND) et dilués au 10 (10^{-1}) ; 5 et 6, 11 et 12, 17 et 18, 25 et 26 : CLI avec apport de 3800 UFC/100 g de CLI, extraits ND et 10^{-1} ; 7 et 8, 13 et 14, 17 et 18, 27 et 28 : CLI avec apport de $3,8 \cdot 10^6$ UFC/100 g de CLI, extraits ND et 10^{-1} .

5.1.2. Recherche des *E. coli* O157 par IMS

Les bouillons d'enrichissement préparés avec des CLI contaminés par *E. coli* O157 :H7 ont été analysés, directement ou après filtration ou centrifugation, par la technique d'IMS. Les suspensions obtenues par IMS ont été ensuite étalées sur géloses spécifiques (O157 : H7 ID et CT-SMAC).

Dans les échantillons analysés directement, des colonies caractéristiques d'*E. coli* ont été retrouvées sur ces deux géloses : colonies de coloration bleu-vert sur O157 :H7 ID, et colonies incolores avec un centre marron sur CT-SMAC et pour les deux concentrations en *E. coli* O157 des CLI (tableau 3).

Les étapes de centrifugation ou de filtration ont permis de limiter les interférences par les débris de coquillages lors de l'IMS et de diminuer le nombre de colonies non recherchées (toutefois, au cours de cet essai, les CLI provenant de coquillages commercialisés étaient peu contaminés par d'autres bactéries ; tableau 3). L'analyse après filtration des bouillons a permis de retrouver les colonies caractéristiques pour les deux concentrations en *E. coli* O157 : H7. La centrifugation des bouillons a conduit à une perte plus importante de bactéries conduisant à des colonies caractéristiques sur milieux spécifiques (tableau 3).

Concentra- tions en <i>E. coli</i> O157 dans les CLI avant enrichissement (en UFC/100 g de CLI)	Préparation des bouillons d'enrichissement après incubation de 6 h à 37°C	CT-SMAC		O157 :H7 ID	
		Colonies caractéristiques (coloration bleu- vert)	Autres colonies	Colonies caractéristiques (incolore à centre marron)	Autres colonies
0	Analyse directe	0	5	0	7
0	Filtration	0	0	0	0
0	Centrifugation	0	0	0	0
7,4	Analyse directe	14	4	3	3
7,4	Filtration	2	0	8	1
7,4	Centrifugation	0	0	2	0
745	Analyse directe	Environ 300*	0	Environ 300*	1
745	Filtration	Environ 170*	0	Environ 180*	0
745	Centrifugation	85	0	Environ 120*	0

Tableau 3 : Dénombrement des colonies caractéristiques d'*E. coli* O157 après isolement sur géloses spécifiques des suspensions obtenues par IMS à partir des bouillons d'enrichissement des CLI artificiellement contaminés par *E. coli* O157. * nombreuses colonies confluentes.

Suite à ces résultats, l'analyse par IMS/culture des échantillons naturellement contaminés a été réalisée sur les bouillons d'enrichissement directement et après filtration.

5.2. Analyse des coquillages

5.2.1. Recherche des *E. coli* O157 : H7

Lors de la recherche spécifique par IMS O157 et culture sur milieux spécifiques, aucun *E. coli* O157 n'a été isolé à partir des 48 bouillons d'enrichissement des CLI et des hépatopancréas analysés provenant des 24 lots de coquillages collectés. Des réactions croisées (colonies caractéristiques sur milieux spécifiques et tests au latex O157 positifs) ont été

observées avec *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefaciens* et *Enterobacter cloacae* présents dans les coquillages.

Bien qu'aucune souche *E. coli* O157 n'ait été isolée, la filtration des bouillons d'enrichissement obtenus à partir des CLI semble faciliter la recherche en évitant les interférences par les débris de coquillages lors de l'IMS et donc en obtenant une meilleure séparation.

5.2.2. Recherche des VTEC par PCR

5.2.2.1. Recherche des gènes *stx*

Sur les 24 lots de coquillages analysés, 7 se sont avérés contenir des gènes *stx* (tableau 4) ; soient 11 des 48 bouillons d'enrichissement obtenus à partir des CLI et des Hp. Sur les lots de coquillages PCR *stx* positive, 4 provenaient de zones conchylocoles classées en B (sites 1, 2, 5 et 6 ; 21 lots analysés) et 3 du site 7, interdit à la conchyliculture (coquillages implantés en sortie de station d'épuration ; 3 lots analysés).

Echantillons	Dates	Coquillages	<i>E. coli</i>	PCR <i>stx</i> ¹	Partie du coquillage analysée	Bouillon d'enrichis- sment	Sequencage du fragment de 323 pb	Facteurs de virulence par PCR				Hydridation sur colonie (sondes <i>stx</i>)	Souches isolées
								<i>stx1</i> ²	<i>stx2</i> ²	<i>eaeA</i> ³	<i>ehx</i> ⁴		
1b	13.01.03	Moules	4030	+	CLI	D,F	<i>stx1</i>	+	+	nd	+	non	
				+	Hp	F	<i>stx1</i>	+	-	nd	-	non	
2a	23.09.02	Moules	189	+	CLI	F	<i>stx1</i>	+	-	nd	-	non	
				+	Hp	D,F	<i>stx1</i>	+(D,F)	+(F)	nd	+	oui	<i>E. coli stx1</i> +
5b	06.01.03	Moules	1300	+	CLI	F	<i>stx2</i>	-	+	nd	+	oui	<i>E. coli stx+</i> <i>ehx</i> +
6a	16.09.02	Moules	321	+	CLI	F	<i>stx2</i>	-	+	+	-	non	
7a	01.10.02	Huîtres	160000	+	CLI	D,F	<i>stx1</i>	+	-	+	+	oui	non
				+	Hp	D,F	<i>stx1</i>	+	-	-	+	non	
7b	11.02.03	Huîtres	nd	+	CLI	D,F	nd	+	+	nd	+	non	
				+	Hp	D,F	nd	+	-	nd	+	non	
7c	12.05.03	Huîtres	4900	+	CLI	D,F	nd	+	+	-	+	oui	non

Tableau 4 : Echantillons PCR *stx* positif : 7/24 lots de coquillages prélevés dans l'environnement.

¹ selon Read *et al.* (1992) ; ² selon Cebula *et al.* (1995) avec de légères modifications ; ³ selon Paton et Paton (1998) ; ⁴ selon Reid *et al.* (1999). 1 : site de prélèvement de coquillages ; a : 1^{er} prélèvement, b : 2nd prélèvement ; c : 3^{ème} prélèvement ; nd : non déterminé ; D : analyse directe ; F : analyse après filtration des bouillons d'enrichissement ; + : détection du gène ; - : absence de détection.

Les résultats obtenus ont montré que la filtration des bouillons d'enrichissement avant extraction des ADNs améliorait la détection des gènes *stx* dans les coquillages. En effet, 11 des 48 bouillons d'enrichissement analysés après filtration étaient positifs par PCR *stx* contre seulement 7 des 48 bouillons analysés directement (tableau 4). Les résultats positifs lors de l'analyse des bouillons après filtration et négatifs lors de leur analyse directe s'expliquent par le fait que des inhibiteurs de PCR étaient présents dans les extraits d'ADNs (hypothèse confirmée par les résultats négatifs obtenus pour les mêmes extraits dopés par de l'ADNs de souche *stx* positive). Cette étape de filtration permet d'éviter quelques faux négatifs en limitant les interférences par des composés autres que des bactéries.

Le séquençage du fragment amplifié par cette PCR *stx* (8 produits PCR testés) a confirmé qu'il correspondait à une région du gène *stx* codant pour une vérotoxine. Six fragments (provenant des CLI et des Hp des lots 2a, 7a, 1b) provenaient d'une partie du gène *stx1* tandis que les deux autres (provenant des CLI des lots 6a et 5b) d'une partie du gène *stx2* (Tableau 4).

La recherche des gènes *stx1* et des gènes *stx2* dans les extraits d'ADNs PCR *stx* positifs a conduit à la détection des gènes *stx1* seuls, dans 4 bouillons d'enrichissement (Hp 1b ; CLI 2a ; CLI et Hp 7a), des gènes *stx2* seuls, dans 2 bouillons (CLI 5b et CLI 6a) et des deux gènes, dans 4 bouillons (CLI 1b ; Hp 2a ; CLI 7b ; CLI 7c). Les autres gènes de virulence (*ehx* et *eae*) ont également été détectés dans les extraits d'ADNs PCR *stx* positifs soient dans 8 des 11 bouillons pour le gène *ehx* et dans 2 des 4 bouillons testés pour le gène *eae* (tableau 4).

5.2.2.2. Recherche de souches *E. coli* vérotoxiques

Deux souches *E. coli* vérotoxiques ont été isolées par la technique d'hybridation sur colonie à partir de deux bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs d'hépto-pancréas (lot 2a) : souche *stx1* positive et *stx2*, *eae*, *ehx* négative et de chair et liquide intervalvaire (lot 5b) : souche *stx* positive (non *stx1* non *stx2*), *ehx* positive et *eae* négative. Le caractère vérotoxique de cette souche positive lors de la détection de l'ensemble des gènes *stx* par la technique de Read *et al.* (1992) et négative lors de la détection spécifique du gène *stx1* ou du gène *stx2* est en cours d'évaluation par P. Feng (Etats-Unis). Les souches sont des *E. coli* non O157, O55, O111 et O26.

5.3. Contamination en *E. coli* (témoin de contamination fécale) des sites de prélèvement des coquillages

5.3.1. Coquillages analysés au cours de l'étude

Les concentrations en *E. coli* ont été également déterminées dans les lots de coquillages afin d'obtenir une information sur la contamination d'origine fécale des coquillages analysés. Elles ont varié de < 18 à 160 000 / 100 g de CLI (Tableau 5). Les échantillons PCR *stx* positive correspondaient à des coquillages contaminés par 189 à 160 000 *E. coli* / 100 g de CLI (Tableau 5) et les échantillons négatifs à des coquillages contaminés par moins de 18 à 1300 / 100 g de CLI (Tableau 5).

Lots de coquillages	Dates des prélèvements	<i>Escherichia coli</i> (/100 g CLI)	PCR <i>stx</i>
1a ¹	07.10.02	53	-
1b	13.01.03	4030	+
1c	08.04.03	490	-
2a	23.09.02	189	+
2b	20.01.03	163	-
2c	02.04.03	< 100	-
3a	09.09.02	321	-
3b	06.01.03	< 100	-
3c	04.02.03	100	-
3d	03.04.03	< 100	-
4a	08.07.02	700	-
4b	02.10.02	490	-
4c	28.01.03	950	-
4d	14.04.03	1300	-
4e	28.04.03	400	-
5a	09.09.02	139	-
5b	06.01.03	1300	+
5c	07.04.03	< 18	-
6a	16.09.02	321	+
6b	27.01.03	< 100	✗ -
6c	22.04.03	< 100	-
7a	01.10.02	160000	+
7b	11.02.03	nd	+
7c	12.05.03	4900	+

Tableau 5 : Concentrations en *E. coli* des coquillages analysés au cours de l'étude. ¹ le chiffre correspond au site de prélèvement et la lettre au numéro de prélèvement. Les lots de 1 à 6 sont issus de sites conchylicoles classés en B, les lots 7 sont issus d'un site interdit à la conchyliculture (coquillages implantés en aval d'une station d'épuration).

5.3.2. Données en *E. coli* complémentaires sur les sites étudiés au cours de la période d'étude

Parallèlement à l'étude, les sites de prélèvement (1, 2, 3, 5, 6) ont été analysés une fois par mois pour leur concentration en *E. coli* dans le cadre de la surveillance du réseau REMI de l'Ifremer. Le site 4 a été analysé régulièrement au cours d'un autre programme (Piriou et Abernot-Le Gac, 2003). Les résultats obtenus montrent que sur la période d'étude :

- 1) certains sites étaient très peu contaminés par des bactéries d'origine fécale (par exemple site 3 ; concentrations variant de < 100 à 321 / 100 g de CLI sur 12 analyses ; moyenne géométrique MG 105 / 100 g),
- 2) certains sites (1, 4 et 6) pouvaient être contaminés de façon temporaire (site 1, une concentration en *E. coli* supérieure à 4600 / 100 g de CLI ; concentrations variant de < 30 à 5600 *E. coli* / 100 g de CLI sur 11 analyses , moyenne géométrique, MG 586 / 100 g et site 6, une concentration > 4600 / 100 g de CLI ; concentrations variant entre 30 à 6700 / 100 g de CLI sur 12 analyses, MG 122 / 100 g).

Ces résultats illustrent les variations de contamination en *E. coli* des coquillages qu'il est possible d'observer d'une zone de production à l'autre et d'un prélèvement à l'autre (sur une année) au sein d'une même zone de production.

6. Discussion

Le but de cette étude était tout d'abord d'établir le protocole le plus adapté pour rechercher les VTEC dans les coquillages. Le protocole suivant a été retenu après étude sur des coquillages contaminés : les bactéries ont été recherchées dans les chairs de coquillage et liquides intervalvaires et dans les hépatopancréas après une étape d'enrichissement. Les bouillons d'enrichissement obtenus ont été filtrés ou analysés directement, 1) par immunoséparation magnétique et culture sur géloses spécifiques (recherche des *E. coli* O157), 2) par extraction des acides nucléiques et recherche des gènes *stx* par PCR. A partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs, les souches vérotoxiques ont été recherchées par hybridation sur membrane.

Les premiers résultats montrent que la détection des VTEC dans les coquillages est possible à partir d'un enrichissement des CLI (détection des gènes *stx* dans 7 bouillons ; une souche isolée) ou des hépato-pancréas (détection des gènes dans 4 bouillons ; une souche isolée). Le fait que des résultats différents soient obtenus lors de l'analyse des coquillages entiers et des hépato-pancréas pourrait être attribué à une hétérogénéité des coquillages au sein d'un même lot plutôt qu'à une perte des bactéries par l'analyse simplement des hépato-pancréas ; la détection des gènes *stx1*, *stx2*, *eae* ou *ehx* seulement dans les CLI ou seulement dans les Hp pour certains lots est en faveur de cette hypothèse. Toutefois, l'acquisition de données supplémentaires est nécessaire pour la confirmer.

Comme nous l'avons observé sur les coquillages artificiellement contaminés, la filtration des bouillons d'enrichissement permet de diminuer la présence d'inhibiteurs de la PCR et d'éviter ainsi de faux négatifs ; 11 des 48 bouillons d'enrichissement analysés après filtration étaient positifs par PCR *stx* contre seulement 7 des 48 bouillons analysés directement. Le fait qu'aucune souche *E. coli* O157 n'ait été isolée par IMS et culture sur géloses spécifiques ne permet pas de confirmer l'intérêt de la filtration des bouillons d'enrichissement sur la détection des bactéries par cette technique ; toutefois, elle semble diminuer les interférences par les débris de chairs de coquillages et les autres bactéries.

La recherche de souches vérotoxiques à partir des enrichissements PCR *stx* positifs de coquillage a permis l'isolement de deux souches. Toutefois, l'application de cette technique sur des coquillages collectés dans l'environnement a rencontré quelques difficultés : bactéries stressées par leur passage dans l'environnement difficilement cultivables, présence de nombreuses bactéries de l'environnement envahissant certaines géloses non spécifiques, présence de colonies de toute petite taille non retenues lors de la réalisation de l'empreinte ou complètement collée à la membrane. Cette dernière particularité (petite colonie entièrement collée à la membrane d'hybridation) a pu expliquer la formation de « spots » (hybridation positive) sans possibilité de retrouver la colonie sur la boîte ayant servi de support à l'hybridation (situation observée à partir de 2 lots de coquillages implantés en aval de la station d'épuration).

Le choix de la recherche de l'ensemble des VTEC plutôt que le seul *E. coli* O157 semble plus judicieux lors de l'analyse d'échantillons de l'environnement (aucune souche *E. coli* O157 détectée ; deux souches vérotoxiques non O157 isolées). L'analyse de lots de coquillages supplémentaires permettra d'avoir une idée plus précise.

Sur les 24 lots de coquillages collectés dans l'environnement marin au cours de cette étude, la présence de gènes *stx* a été détectée dans 4 lots provenant de zones conchylicoles et dans 3 provenant du site interdit à la conchyliculture. Une étude réalisée aux Etats-Unis a mis en évidence également la présence de gènes *stx* dans des coquillages (2/44 lots de palourdes ; après enrichissement) par hybridation avec une sonde ADN *stx2* (résultats négatifs avec

une sonde *stx1* ; Samadpour *et al.*, 1994). Une étude réalisée en France (Dupray *et al.*, 1999) a montré que des gènes *stx* étaient présents dans des coquillages prélevés dans une zone de production en aval d'un bassin versant à fortes activités agricoles (correspondant au site 3 de notre étude) ; 19 % des échantillons de coquillages analysés (7/36 ; à raison de 6 lots de coquillages prélevés lors de 6 campagnes de prélèvement faisant suite de préférence à des épisodes pluvieux ; étude sur 2 ans). Les 4 lots de coquillages analysés dans le même site au cours de notre étude se sont avérés, par contre, négatifs ; la faible contamination en *E. coli* des coquillages pouvant éventuellement expliquer cette différence < 100 à 321 / 100 g de CLI. Au cours de l'étude de Dupray *et al.* (1999), la présence des seuls gènes de vérotoxines (*stx1* ou *stx2*) avait été recherchée, ce qui ne permettait pas de renseigner sur la provenance de ces gènes (bactériophages, bactéries cultivables ou mortes).

Les gènes *stx* ont été détectés dans des coquillages en janvier (lots 1b ; 5b), en septembre (lots 2a et 6a) dans les zones conchylicoles et en février, mai et septembre pour le site 7 en sortie de station d'épuration. Lors d'épisodes pluvieux, la dilution de l'eau de mer par des apports plus importants d'eaux douces semble un facteur favorisant cette contamination. Dans les deux sites sous influence principalement de rejets d'origine agricole (3 et 4) et donc *a priori* plus susceptibles d'héberger des VTEC, la recherche des gènes *stx* dans les coquillages s'est cependant avérée négative dans les 9 lots analysés ; la faible contamination d'origine fécale (concentrations en *E. coli* variant de < 100 à 1300 / 100 g de CLI) de ces coquillages pourrait expliquer ce résultat.

Un des intérêts de l'étude était d'isoler des souches *E. coli* vérotoxiques après détection des gènes *stx*. Deux souches VTEC (non *E. coli* O157) ont été isolées de 2 zones conchylicoles classées en B*. Des souches VTEC non O157 ont été également isolées dans des coquillages, en Inde, au cours de l'étude de Sanath Kumar *et al.* (2001). Deux souches, *E. coli stx* et *hlyA (ehx)* positives ont été mis en évidence dans des palourdes commercialisées, à partir de bouillons d'enrichissement de 6 h à 37°C étalés sur gélose SMAC ; les souches étant caractérisées génétiquement par PCR. Dans une autre étude, parmi 590 souches d'*E. coli* isolées à partir d'huîtres et de préparation à bases d'huîtres prélevées sur le marché à Tobago et Trinidad, 12 souches *E. coli* O157 ont été isolées ; il est important de préciser que ces huîtres et préparations étaient de très mauvaise qualité sanitaire. Les auteurs suggèrent qu'en plus des *E. coli* O157 isolés, des VTEC non O157 étaient susceptibles d'être présents dans ces coquillages (Rampersad *et al.*, 1999).

Dans notre étude, sur les 7 lots de coquillages où les gènes *stx* ont été détectés, seules deux souches ont été isolées (à partir de 2 lots de coquillages). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce faible pourcentage de recouvrement de souches *E. coli* vérotoxiques : 1) leur présence faible dans l'environnement côtier, 2) la difficulté d'isoler des souches à partir d'échantillons de l'environnement : présence de très nombreuses bactéries interférentes (formant des colonies confluentes sur milieu non spécifique) rendant difficile la lecture des géloses lors de l'hybridation sur colonie, 3) les gènes *stx* détectés dans les coquillages, tout particulièrement ceux collectés sur le site 7 en aval d'une station d'épuration pourraient provenir de bactériophages. En effet, Muniesa et Joffre (1998) ont évalué la prévalence de bactériophages portant le gène *stx2* dans des effluents d'origine urbaine ; des concentrations en phages infectieux pour *E. coli* O157 : H7 et porteurs de gène *stx2* comprises entre 1 et 10 par millilitre d'effluent ont été trouvées au cours de leur étude. Ces phages ont été recherchés également dans des effluents urbains provenant de

* Ces coquillages ne peuvent être consommés directement ; ils doivent subir une épuration de 48 heures susceptible d'éliminer ces *E. coli*.

différents pays et étaient présents dans 9 des 10 effluents prélevés en France (Muniesa et Joffre, 2000).

Bien qu'aucune souche dans notre étude n'ait été isolée dans les coquillages en aval de la station d'épuration (site 7), on ne peut pas exclure que des souches *E. coli* vérotoxiques soient libérées dans l'environnement par des effluents urbains : en effet, deux études ont montré que des VTEC pouvaient être présents dans de tels effluents ; isolement de 5 souches à partir de 31 effluents de station d'épuration (Höller *et al.*, 1999) et de 8 souches à partir de 498 prélèvements d'effluents ou boues de station d'épuration (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

L'absence de mise en évidence d'*E. coli* O157 par la technique IMS O157, puis culture sur milieux spécifiques, dans les coquillages analysés au cours de notre étude est en accord avec les résultats obtenus au cours de deux études portant sur la détection de ces bactéries dans des coquillages et appliquant la même technique (Guyon *et al.*, 2000 ; MacRae *et al.*, 2003). A partir de 150 lots d'huîtres commercialisées en France, une seule souche *E. coli* O157 (*E. coli* O157 : H- possédant les gènes *stx1*, *stx2c*, *eae*, *EHEC-hlyA*) a été isolée (Guyon *et al.*, 2000). A partir de 192 lots de coquillages (huîtres, moules, palourdes, coques et coquilles Saint-Jacques ; étude sur 12 mois) de diverses provenances anglaises, aucune souche *E. coli* O157 n'a été isolée (MacRae *et al.*, 2003).

7. Conclusions

La première phase du projet a permis de mettre en place un protocole adapté à la recherche des *Escherichia coli* vérotoxiques et des *E. coli* O157 dans des coquillages (essais sur des coquillages artificiellement contaminés). Ce protocole a été ensuite appliqué à la détection de ces bactéries dans 24 lots d'huîtres ou de moules collectés dans l'environnement côtier.

Les premiers résultats obtenus, intéressants sur le plan sanitaire, seraient plutôt en faveur de l'absence de souches *E. coli* O157 et de la présence de souches *E. coli* vérotoxiques non O157 dans l'environnement marin (coquillages). Par ailleurs, la présence des gènes *stx* (4/21 lots de coquillage) et de souches VTEC (2 isolées) semble plutôt faible dans les zones conchylicoles classées en B* ; cependant, il serait intéressant de tester différentes périodes puisqu'il a été remarqué que la fréquence de ces bactéries peut augmenter après les périodes pluvieuses. Deux souches vérotoxiques ont été isolées : le pouvoir pathogène de la souche isolée possédant le gène *stx1* semble modéré (absence des autres gènes de virulence) et celui de l'autre souche est en cours d'évaluation.

Les gènes *stx* ont été détectés à différentes périodes de l'année et non seulement en été, période la plus propice à une excrétion des VTEC par les bovins qui constituent le principal réservoir.

Dans le cas de prélèvements issus du milieu marin, il semble préférable de rechercher les VTEC par la présence des gènes *stx* (par technique de PCR) plutôt que la présence de leur chef de file *E. coli* O157 : H7 (par la technique IMS) : le *E. coli* O157 étant, d'après ces premiers résultats, moins susceptible d'être rencontré en milieu marin que les autres souches VTEC. Si toutefois un *E. coli* O157 possédant les gènes *stx* était présent dans l'environnement, la recherche des gènes *stx* par PCR, puis de la colonie par hybridation, serait susceptible de le mettre en évidence.

Ces premiers résultats ayant montré que des VTEC pouvaient être présents dans le milieu marin, il semble indispensable de poursuivre cette recherche pour obtenir un plus grand nombre de données. Ces dernières seront obtenues au cours de la deuxième phase du projet financé par l'ART5, microorganismes et environnement côtier, du PNEC. Afin d'obtenir une notion quantitative de la contamination, la technique de PCR quantitative en temps réel sera également mise au point pour des échantillons de l'environnement au cours de cette deuxième phase.

* Les coquillages doivent subir une épuration avant commercialisation

8. Références bibliographiques

- Ackman D., Marks S., Mack P., Caldwell M., Root T., Birkhead G., 1997. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection : Evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiology and Infection*, 119, 1-8.
- Bettelheim K. A., 2000. Role of non-O157 VTEC. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 38S-50S.
- 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 different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 631-635.
- Boudailliez B., Berquin P., Mariani-Kurkdjian P., Ilf D. D., Cuvelier B., Capek I., Tribout B., Bingen E., Piussan C., 1997. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* 0111 - Associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 11, 36-39.
- Bouvet J., Bavai C., Rossel R., Le Roux A., Montet M. P., Ray Gueniot S., Mazuy C., Arquilliere C., Vernozy Rozand C., 2001. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157 : H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 249-255.
- Cebula T. A., Payne W. L., Feng P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157 : H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 248-250.
- Chalmers R. M., Aird H., Bolton F. J., 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 124S-132S.
- Cody S. H., Glynn M. K., Farrar J. A., Cairns K. L., Griffin P. M., Kobayashi J., Fyfe M., Hoffman R., King A. S., Lewis J. H., Swaminathan B., Bryant R. G., Vugia D. J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine*, 130, 202-209.
- Conedera G., Chapman P. A., Marangon S., Tisato E., Dalvit P., Zuin A., 2001. A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 85-93.
- Cornick N. A., Booher S. L., Casey T. A., Moon H. W., 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4926-4934.
- Dupray E., Caprais M.P., Derrien A., Monfort P., Convenant A., Penot J., Fach P., Dilasser F., Pérelle S., Grout J., Federighi M., Jugiau F., Rama F., 1999. Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de la Fresnaye. Dans : *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*, Editions Ifremer, 169-178.
- Enriquez C., Nwachuku N., Gerba C. P., 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. *Review on environmental health*, 16, 117-131.
- Espié E., Grimont F., Vernozy-Rozand C., Vaillant V., De Valk H., 2003. An outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with mutton consumption. France, June 2002. Symposium VTEC, juin 2003, Edinborough. Poster P-211.
- Feldhusen F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 1651-1660.
- Feng P., Lampel K. A., Karch H., Whittam T. S., 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Infectious Diseases*, 177, 1750-1753.

- Fenlon D. R., Ogden I. D., Vinten A., Svoboda I., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 149S-156S.
- Grimont F., 1998. Recherche de *Escherichia coli* pathogènes dans les selles. *Spectra biologie*, 17, 27-36
- Griffin P.M., Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Swerdlow D.L., 2003. Epidemiology of 283 outbreaks of *Escherichia coli* O157 : H7 infections in the 20th century, United states. Symposium VTEC, Edinbough, June 2003, Communication orale CO-2.
- Guyon R., Dorey F., Collobert J. F., Foret J., Goubert C., Mariau V., Malas J. P., 2000. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sciences Des Aliments*, 20, 457-465.
- Hancock D., Besser T., Lejeune J., Davis M., Rice D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 71-78.
- Haeghebaert S., De Parscau L., Le fur J. M., Bouvet P., Guenoden R., Bastian S., Vaillant V., De Valk H., 2001a. Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique pédiatriques, département du Finistère, 1993-2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 37, 181-184.
- Haeghebaert S., Vaillant V., Bouvet P., Grimont F. et le réseau des néphrologues pédiatres, 2001b. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 1999. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 37, 177-180.
- Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommepuy M., sous presse. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Bacteriology*.
- Hiramatsu R., Matsumoto M., Miwa Y., Suzuki Y., Saito M., Miyazaki Y., 2002. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 922-925.
- Höller C., Koschinsky S., Witthuhn D., 1999. Isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *The Lancet*, 353, 2039.
- Le Guyader F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Pommepuy M., 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 3241-3248.
- LeJeune J. T., Besser T. E., Hancock D. D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3053-3057.
- Lipp E. K., Rose J. B., 1997. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 16, 620-640.
- Makino S., Kobori H., Asakura H., Watarai M., Shirahata T., Ikeda T., Takeshi K., Tsukamoto T., 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology and Infection*, 125, 55-61.
- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V. *et al*, 1999. Food related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 5, 607-625.
- Michino H., Araki K., Minami S., Takaya S., Sakai N., Miyazaki M., Ono A., Yanagawa H., 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150, 787-796.
- Muniesa M. et Jofre J., 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga Toxin 2 Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2443-2448.
- Muniesa M., Jofre J., 2000. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the *stx 2* gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol. Let.*, 183, 197-200.

- Miyagi K., Omura K., Ogawa A., Hanafusa M., Nakano Y., Morimatsu S., Sano K., 2001. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiology and Infection*, 126, 129-133.
- Norme NF ISO 7251, septembre 1994. Microbiologie - Directives générales pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés - Technique du nombre le plus probable.
- Norme NF V08-106, janvier 2002. Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants - Technique indirecte par impédancemétrie directe
- Ogden I. D., Fenlon D. R., Vinten A. J. A., Lewis D., 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 111-117.
- Paunio M., Pebody R., Keskimäki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Vuotari V., Siitonen A., Lahti E., Leinikki P., 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7. *Epidemiology and Infection*, 122, 1-5.
- Piriou J.Y. et Abernot-Le Gac C., 2003. Suivi des apports à l'estuaire de l'Aber Benoît . Rapport interne Ifremer, 44 p.
- Rampersad F. S., Laloo S., La Borde A., Maharaj K., Sookhai L., Teelucksingh J., Reid S., McDougall L., Adesiyun A. A., 1999. Microbial quality of oysters sold in Western Trinidad and potential health risk to consumers. *Epidemiology and Infection*, 123, 241-250.
- Randall L. P., Wray C., Davies R. H., 1999. Survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 under simulated farm conditions. *The Veterinary Record*, 145, 500-501.
- Read S. C., Clarke R. C., Grandis S. A. d., Hii J., McEwen S., Gyles C. L., 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 153-161.
- Riley L. W., Remis R. S., Helgerson S. D., Mac Gee H. B., Wells J. G., Davis B. R., Herbert R. J., Johnson L. M., Margrett N. T., Blake P. A., Cohen L. A., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308, 681-685.
- Samadpour M., Ongerth J. E., Liston J., Tran N., Nguyen D., Whittam T. S., Wilson R. A., Tarr P. I., 1994. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1038-1040.
- Sanath Kumar H., Otta S. K., Karunasagar I., Karunasagar I., 2001. Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 334-338.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H., Karch H., 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1205-1208.
- Tuttle J., Gomez T., Doyle M. P., Wells J. G., Zhao T., Tauxe R. V., Griffin P. M., 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection*, 122, 185-192.
- Vernozy-Rozand C., Feng P., Montet M. P., Ray-Gueniot S., Villard L., Bavai C., Meyrand A., Mazuy C., Atrache V., 2000. Detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in heifers' faecal samples using an automated immunoenrichment system. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 217-222.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Ray-Gueniot S., BoutrandLoei S., Meyrand A., Richard Y., 1998. Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection*, 61, 917-920.

- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., 2001. *Escherichia coli* O157 : H7. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 135 p.
- Vernozy-Rozand C., Montet M., Lequerrec F., Serillon E., Tilly B., Bavai C., Ray-Gueniot S., Bouvet J., Mazuy-Cruchaudet C., Richard Y. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J. Appl Microbiol*, 93, 473-478.
- Wallace J. S., Cheasty T., Jones K., 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 399-404.
- Yam W. C., Chan C. Y., Ho Bella S. W., Tam T. Y., Kueh C., Lee T., 1999. Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. *Water Research*, 34, 51-56.

9. Abréviations

CLI : Chairs et liquides intervalvaires

CT-SMAC : Gélose Mac Conkey au sorbitol avec apport de céfixime et tellurite

E. coli : *Escherichia coli*

EPT : Eau peptonée tamponnée

Hp : Hépto-pancréas

IMS : Immunoséparation magnétique

MG : Moyenne géométrique

PBS : Tampon phosphate salé (Phosphate Buffer Saline)

PCR : Poymerase Chain Reaction

UFC : Unité formant colonie

VTEC : *Escherichia coli* vérotoxique

10. Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Jean-Claude Le Saux (DEL/CC) pour la mise en place et l'approvisionnement des poches d'huîtres sur les sites 4 et 7, Pascale Ceceille, stagiaire à DEL/MIC pour la réalisation de certaines analyses par PCR, Dominique Hervio-Heath (DEL/MIC) pour ses conseils et son aide, Marie-Paule Caprais (DEL/MIC) pour sa participation lors des dissections des hépato-pancréas et Severine Tourbot-Paul (DEL/MIC) par sa contribution lors de la mise en page de ce rapport.

Ils remercient également les différentes personnes des laboratoires côtiers de l'Ifremer ayant assurées le prélèvement des coquillages et les analyses *E. coli*, tout particulièrement : Vincent Duquesne (DEL/BL), Laure Lamort (DEL/PB), Michel Rougerie (DEL/SM), Sylviane Boulben et Patrick Monfort (DEL/CC), Annick Derrien (DEL/LR), Fabienne Chavanon et Sabine Danssaert (DEL/PAC).

Annexe

Annexe 1 : Classement des zones conchylicoles

Directive européenne 91/492/CEE du 15 juillet 1991

Arrêté d'application du 21 mai 1999

Nombre d' <i>Escherichia coli</i> dans 100 g C L I				
Classe	230	1000	4600	46000
A	$\geq 90\%$	$\leq 10\%$	0%	
B	$\geq 90\%$		$\leq 10\%$	0%
C	$\geq 90\%$			$\leq 10\%$
D				$> 10\%$

CLI : chair et liquide intervalvaire

A : vente directe

B : vente après purification ou reparcage

C : vente après reparcage de longue durée

D : vente interdite

Annexe 2 : Poster présenté au 5^{ème} symposium international : Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections, Edimbourg, 8-11 juin 2003

Determination of an adapted protocol to detect verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157 : H7 in shellfish collected from coastal environment.

M. Gourmelon¹, M.P. Montel², S. Loëac³, C. Le Mennec³, D. Hervio-Heath³, M. Pommepuy³, J. Bouvet¹ and C. Vemazy-Rozand¹
¹Laboratoire de Microbiologie, DEL, Ifremer, B.P. 70, 29280 Plouzané, France
²Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, 69280 Marcy l'étoile, France
 Contact address : mgourmel@ifremer.fr



Introduction

The coastal marine environment could be contaminated by sewage or agricultural waste. Due to the presence of some bacterial or viral pathogens, humans could be contaminated during recreative activities and while eating seafood. In fact, shellfish, because of their filter-feeding activity can concentrate and retain pathogenic microbes present in surrounding waters. Because of the traditional consumption of bruvie shellfish species – raw or undercooked – contaminated ones have been implicated in some food-borne diseases. Among bacterial pathogens, the prevalence of VTEC and *E. coli* O157:H7 in shellfish of shellfish harvesting areas is not well documented. In this study, we wanted to develop the most adapted protocol to evaluate their presence in shellfish and to analyse naturally-contaminated shellfish. The first results of this study are presented below.

Materials and methods

1. Optimisation of the VTEC detection protocol from shellfish tissues

Some assays were conducted on washed shellfish (SF) in order to determine the most adapted protocol which would limit the presence of PCR inhibitors in environmental samples. Shellfish from different origins were inoculated and contaminated with a *E. coli* strain carrying *stx* genes. Thereby, the presence of both *stx* genes (STX1 and STX2) in the presence of the bacterial strain (1000 or 100 000 CFU per 100 g of SF) at rest. The enrichment broths obtained after a 24 h incubation at 37°C were analysed (1) directly, (2) using a filter-sterilized bag with filter (3) after a 1000 g, 2 min centrifugation at 4000 rpm after a filtration step (4) and a 22 µm filter. Results were more than satisfactory and *stx* genes detected by PCR (see below for routine work selection and PCR conditions).

2. Analyses of naturally-contaminated shellfish

1. Sample collection
 Naturally contaminated shellfish (24 batches of 20 to 25 oysters or 80 to 200 mussels) were submitted at least 3 times from June 2002 to May 2003 at 7 sampling stations along the French coast (Fig. 1). 10 after 11 (a) were shellfish harvesting areas in B category shellfish (with a maximum of 1000 E. coli per 100 g of SF or 30 % of samples) and for 40 hours before consumption (European Directive 91/482/EEC) and (17) in a non-classified area (not considered to be highly risked for the sake of a sewage treatment plant and direct agricultural activities). 40 samples were transported to the laboratory in insulated coolers and analyzed within 24 to 48 hours.



Figure 1 : Sites where shellfish were collected for the VTEC analyses. Shellfish analysed were oysters (1-4, 6, 7) and mussels (5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25).

- 2. Shellfish faecal contamination (*E. coli*)
 The contamination was estimated by MPN (ISO 7251) or conductance (Ahor V08-108) methods.
- 3. Sample preparation for *E. coli* O157 and VTEC detection
 DNA extraction was performed as described by Hervio-Heath et al. (2002). Shellfish flesh (x 100 g) was homogenized in a Waring blender for 90 s. Enrichment broths were prepared by diluting 25 g of SF or 10 g of Hp (1:10) in BPHW and incubated at 37°C for 6 hours (IMS analyses) or 24 hours (PCR *stx* detection).
- 4. Isolation of *E. coli* O157
E. coli O157 was isolated using immunomagnetic separation (IMS) method (ISO 16554). Bacteria were recovered from CT-SMAC and O157:H7 ID media (BioMérieux). Presumptive colonies were tested with a latex agglutination *E. coli* O157 kit (Oxoid) and with biochemical API 20 E strip (BioMérieux).
- 5. Isolation of VTEC
 DNA extraction was performed as described by Bouvet et al. (2002).
 PCR detection of *stx* genes
 Detection of *stx* genes was performed with degenerate primers (Reed et al. 1992) which amplified a 323 bp fragment of the A-subunit of *stx* gene. PCR detection was performed as described by Bouvet et al. (2002).
 VTEC strains were recovered from *stx*-positive samples by colony hybridization as described by Vemazy-Rozand et al. (2002).
 Bacterial strain identification and characterization
 Strains isolated were serotyped and genetically characterized using the following genes: *stx1*, *stx2* following the nomenclature of Cebara et al. (1995), *eae* (*E. coli* adhering and effluxing) under the conditions of Reed et al. (1999) and *eae* (enterohemorrhagic) according to the conditions of Paton and Paton (1998).

Results

1. Optimisation of the VTEC detection protocol from shellfish tissues

The 8 µm and 0.22 µm filtrations of the 24 h-enrichment broths were the most adapted to remove inhibitors from DNA suspensions and to improve the detection of the *stx* gene from washed shellfish (Fig. 2).



Figure 2: Detection of *E. coli* carrying *stx* genes after filtration of shellfish enrichment broths preparations. Lanes: 1, 24 h enrichment broth; 2, 24 h enrichment broth filtered through 8 µm; 3, 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm; 4, 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm and then 8 µm. Molecular weight markers (100 to 2000 bp) are indicated on the left. *stx* genes were detected in lanes 1, 2, 3 and 4. Lane 1: 24 h enrichment broth; Lane 2: 24 h enrichment broth filtered through 8 µm; Lane 3: 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm; Lane 4: 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm and then 8 µm. *stx* genes were detected in lanes 1, 2, 3 and 4. Lane 1: 24 h enrichment broth; Lane 2: 24 h enrichment broth filtered through 8 µm; Lane 3: 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm; Lane 4: 24 h enrichment broth filtered through 0.22 µm and then 8 µm. *stx* genes were detected in lanes 1, 2, 3 and 4.

Furthermore, the filtration of the 6 h-enrichment broths of *E. coli* O157 seeded shellfish (corresponding to 7 and 745 CFU per 100 g SF) has allowed to recover the *E. coli* O157 and has facilitated its detection by decreasing the interferences with shellfish debris and other bacteria (data not shown).

2. Analyses of naturally-contaminated shellfish

Among the 24 batches of shellfish, 11 were weakly (< 230 *E. coli* per 100 g of SF), 10 moderately (between 230 and 4800 *E. coli* / 100 g), and 2 highly contaminated (area not classified).

E. coli O157 detection

No *E. coli* O157 was isolated by IMS method. Cross-reactions were obtained with *Campylobacter*, *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefaciens* or *Enterobacteriaceae* present in shellfish.

Stx genes detection

Stx genes were detected in 7/24 batches: 4/21 from B category areas, shellfish and 3/3 from highly contaminated area (Tab. 1). Positive *stx* shellfish samples (7) were contaminated by 188 to 180 000 *E. coli* per 100 g of SF (Tab. 1) and negative samples (17) by less than 18 to 1300 per 100 g (data not shown).

VTEC strain isolation

Two *E. coli* non O157 were isolated: one *E. coli* strain carrying the *stx1* gene (serotype non O55, O111 or O26; *eae* and *eae* negative) from Hp enrichment broth (2a, Tab. 1) and one *E. coli* strain carrying the *stx1* (non *stx1* non *stx2*) and *eae* genes from SF enrichment broth (5b, Tab. 1).

Sample	Date	Shellfish	B. cat.	PCR	Pos. of shellfish analysed	Enrichment broth	Enrichment broth filtered	Enrichment broth filtered and then 8µm	Enrichment broth filtered and then 0.22µm	Enrichment broth filtered and then 0.22µm and then 8µm	Colony hybridization (see protocol)	Strain isolated
1a	24.07.02	Mussels	4800	+	2/21	+	+	+	+	+	+	+
2a	23.08.02	Mussels	1000	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+
3a	26.07.02	Mussels	1300	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+
4a	18.09.02	Mussels	111	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+
5a	01.10.02	Mussels	162000	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+
6a	11.08.02	Oysters	44	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+
7a	12.08.02	Mussels	4800	+	0/21	+	+	+	+	+	+	+

Table 1: Positive *stx* PCR samples: 7/24 batches of shellfish collected in coastal environment. 1: according Reed et al. 1992; 2: according Cebara et al. 1995 with slight modifications; 3: according Reed et al. 1999; 4: according Paton and Paton, 1998. a: 1: sampling; b: 2: sampling; c: 3: sampling. nd: not determined; SF: whole shellfish flesh; Hp: Hepatopancreas; D: direct analysis; F: analysis after enrichment broth filtration; +: gene detection; -: no gene detection.

Discussion - Conclusion

This study indicates that the detection of *stx* gene by PCR on filtered enrichment broths and the isolation of *E. coli* strains by colony hybridization would be a reliable protocol and more performant than IMS O157 to evaluate the presence of VTEC in environmental shellfish. These preliminary results show that *stx* genes and *E. coli* strains could be detected in shellfish from different sites and at different times: they were mostly detected after important rainfalls or dilution of marine surrounding waters by potentially contaminated freshwaters. No *E. coli* O157 was isolated. These results are in accordance with those of Sanath Kumar et al. (2001) who detected *stx* but not *stx*O157 (encoding the O157 antigen) genes in shellfish (2/48 batches of clams). In another study (Guyon et al., 2000), one VTEC O157 strain was isolated in French commercial oysters in 1 of 150 analysed batches (*E. coli* concentration < 230 *E. coli* / 100 g SF). More samples are being analysed and data collected to have a more representative idea of the contamination of shellfish by VTEC and *E. coli* O157.

References

Bouvet J., Montel M.P., Loëac S., Le Mennec C., Hervio-Heath D., Pommepuy M., Vemazy-Rozand C., 2002. J. Appl. Microbiol., 93, 5-14.
 Cebara S.R., Payne W.J., Farr P., 1995. J. Clin. Microbiol., 33, 246-252.
 Dupont R., Boreau F., Deléens J., Fares J., Dubert C., Merveu V., Madry J.P., 2000. Sci. Aliment., 20, 487-489.
 Hovgaard A.H., Colwell R.R., O'Brien A., Besser T.E., Frenkel J.M., Pommepuy M., 2002. J. Appl. Microbiol., 93, 1129-1138.
 Paton A.W., Paton J.C., 1998. J. Clin. Microbiol., 36, 588-602.
 Reed S.C., Clarke R.C., Martin A., De Grandis S.A., Hill J., McEwen S., Oyles C.L., 1992. Mol. Cell. Probes, 6, 153-161.
 Reed S.C., Belling D.J., Whittam T.S., J. Clin. Microbiol., 37, 2719-2722.
 Sanath Kumar H., Ota S.R., Karunasagar I., Karunasagar I., 2001. Lett. Appl. Microbiol., 33, 334-336.
 Vemazy-Rozand C., Montel M.P., Lequere F., Serillon E., Tilly H., Boreau F., Bouvet J., Mastly-Cruaudeat C., Richard Y., 2002. J. Appl. Microbiol., 93, 473-478.

Acknowledgements

This work was supported by the French government - Programme National Environnement Côtier (PNEC). The authors thank personal Ifremer laboratories to have collected shellfish and performed *E. coli* analyses.

*Impression : Service TMSI/IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*