

**École Pratique des Hautes Études**

**Doctorat**

Mention : Systèmes intégrés, Environnement et Biodiversité

Présentée par

**Marie-Pierre MONTET**

**Contamination des aliments par les  
*Escherichia coli* producteurs de  
Shiga-toxines (STEC) en France, et importance  
de l'acido-résistance des souches**

**Thèse dirigée par le Pr Geneviève CORDIER**

**Co-dirigée par le Pr Christine ROZAND**

Soutenue le : **3 juin 2009**

**JURY :**

**RAPPORTEUR** : Pr Isabelle Chevallier

**RAPPORTEUR** : Pr Michel Fédérighi

**EXAMINATEUR** : Dr Laurence Mathieu

Laboratoire EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre) :

UMR 754 UCBL-INRA-ENVL-EPHE " Rétrovirus et pathologie comparée" "

50 avenue Tony Garnier

69366 Lyon cedex 07

Directrice de Thèse : Pr Geneviève Cordier

genevieve.cordier@univ-lyon1.fr

Laboratoire d'accueil :

Laboratoire Nationale de Référence

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle (UMAP)

1, avenue Bourgelat

69280 Marcy l'Etoile

Directeur de stage : Pr Christine Rozand

c.rozand@vet-lyon.fr

---

## Résumé

Les plans de surveillance gérés par le Ministère de l'Agriculture et de la Forêt visant à déterminer la prévalence de contamination des viandes et des produits laitiers au lait cru par *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) ont donné jusqu'à ce jour des résultats tout à fait rassurants en termes de santé publique. Les aliments fermentés donc acides ont été associés à des épidémies aux Etats-Unis et en Europe. La détermination de la survie et de la croissance des STEC lors de la fabrication des aliments fermentés est un excellent moyen d'apprécier le danger STEC lié à ces produits. La logique voudrait qu'une souche STEC naturellement acido-résistante survive plus facilement qu'une souche acido-sensible lors de la fermentation. Cette logique a été vérifiée pour les saucissons secs mais pas pour les Camemberts pour lesquels souches STEC acido-résistantes (AR) et acido-sensibles (AS) sont encore présentes en fin d'affinage à des niveaux de contaminations proches de ceux de l'inoculum. Ainsi l'acido-résistance conférerait une supériorité écologique des STEC dans

les saucissons secs mais pas dans les fromages à pâte molle.

La quasi-totalité des souches *E. coli* O157:H7 et *E. coli* O26 de la collection du Laboratoire National de Référence (LNR) sont AR. Ces souches isolées d'aliments, d'eau, et de l'environnement ont en théorie un pouvoir pathogène accru du fait d'un passage facilité de la barrière stomacale des consommateurs. L'outil pour évaluer cette AR pourrait être le test « Gad » optimisé dans le cadre de cette thèse, le mécanisme glutamate décarboxylase étant en effet fortement associé à l'acido-résistance globale des souches.

---

## **TABLE DES MATIERES**

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE GÉNÉRAL

### CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉ RELATIVES AUX *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

#### 1 CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES STEC

##### 1.1 Caractères généraux de l'espèce *E. coli*

##### 1.2 Classification en pathotypes des *E. coli* responsables de troubles intestinaux

##### 1.3 Origine évolutive des STEC

###### 1.3.1 Origine des EHEC

###### 1.3.2 Origine du clone *E. coli* O157:H7

#### 2 FACTEURS DE VIRULENCE DES STEC

##### 2.1 Les Shiga-toxines

###### 2.1.1 Structure des toxines Stx1 et Stx2

###### 2.1.2 Variants stx

###### 2.1.3 Mécanisme d'action des toxines Stx

###### 2.1.4 Rôle des toxines Stx dans la physiopathologie

##### 2.2 Les facteurs d'adhésion intime et le facteur d'attachement et d'effacement

###### 2.2.1 Le système de sécrétion de type III

##### 2.3 Autres facteurs plasmidiques de virulence

- [2.3.1 L'entérohémolysine](#)
- [2.3.2 La protéase EspP](#)
- [2.3.3 Autres facteurs](#)

### [3 PATHOLOGIES HUMAINES ASSOCIÉES AUX EHEC](#)

- [3.1 La colite hémorragique](#)
- [3.2 Le SHU](#)
- [3.3 Le PTT](#)

### [4 EPIDÉMIOLOGIE HUMAINE DES STEC](#)

- [4.1 Principaux modes de transmission](#)
  - [4.1.1 Transmission alimentaire](#)
  - [4.1.2 Transmission hydrique](#)
  - [4.1.3 Transmission inter-humaine](#)
  - [4.1.4 Transmission par le contact avec les animaux de ferme et leur environnement](#)
- [4.2 Principales épidémies](#)

### [5 EPIDÉMIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE DE \*ESCHERICHIA COLI\* O157:H7 ET DES STEC](#)

- [5.1 Portage et excrétion de \*Escherichia coli\* O157:H7 et des STEC chez les bovins](#)
- [5.2 Contamination environnementale](#)
- [5.3 Présence dans les différentes filières agro-alimentaires](#)
  - [5.3.1 Données générale concernant la filière viande bovine](#)
  - [5.3.2 Données générale concernant la filière lait et produits laitiers](#)
  - [5.3.3 Données générale concernant la filière végétale \(légumes et fruits\)](#)
- [5.4 Conclusion](#)

## [CHAPITRE 2: EPIDÉMIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES STEC DANS DES ALIMENTS](#)

### [1 EPIDÉMIE LIÉES À DES ALIMENTS ACIDES CONTAMINÉS PAR DES STEC](#)

- [1.1 Présentation détaillée de certaines épidémies liées aux aliments acides](#)
  - [1.1.1 Aliments d'origine végétale](#)
  - [1.1.2 Aliments d'origine animale](#)
    - [1.1.2.1 Aliments carnés](#)
    - [1.1.2.2 Fromages](#)

### [2 RÉSISTANCE DES STEC AUX PH ACIDES](#)

- [2.1 Survie des STEC à différents pH et en présence d'acides minéraux et d'acides organiques](#)
- [2.2 Mécanismes d'adaptation à l'acidité](#)
  - [2.2.1 Différentes terminologies de réponses au stress acide](#)
  - [2.2.2 Mécanismes décrits chez \*E. coli\* K12](#)

### 2.2.3 Mécanismes décrits chez les STEC

## 3 EFFET DE LA FORMULATION DE LA MATRICE ALIMENTAIRE ET DE SES CONDITIONS DE CONSERVATION SUR LA RÉSISTANCE À L'ACIDITÉ DES STEC

### 3.1 Variabilité de sensibilité des souches aux pH acides

### 3.2 Etudes en milieux synthétiques

### 3.3 Etudes dans les aliments acides

#### 3.3.1 Aliments d'origine végétale

#### 3.3.2 Aliments d'origine animale

##### 3.3.2.1 Fromages

##### 3.3.2.2 Saucissons

---

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADEME	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AR	Acido résistant
AR1	Système oxydatif de résistance à l'acidité nécessitant l'absence de glucose
AR2	Système de résistance à l'acidité nécessitant la présence de glutamate
AR3	Système de résistance à l'acidité nécessitant la présence d'arginine
AR4	Système de résistance à l'acidité nécessitant la présence de lysine
AS	Acido sensible
BHI	Bouillon cœur-cervelle
CRP	cAMP receptor protein
eae	Gène codant l'intimine (Facteur d'attachement/effacement)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
E-hlyA	Entérohémolysine
EPT	Eau Peptonnée Tamponnée
GABA	g-aminobutyrate
GDAR	Système d'acido résistance glutamate-dépendant
GUD	Activité $\beta$ -glucuronidase
IFREMER	Institut Française de Recherche par l'Exploitation de la Mer
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani Agar
LDC	Lysine Décarboxylase
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LT	Entérotoxine Thermolabile
NAR	Non Acide Résistant
ODC	Ornithine Décarboxylase
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Électrophorèse en champ-pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis)
PTT	Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
pHi	pH intracellulaire
pHo	pH extérieur
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SL	Entérotoxine Thermostable
SMAC	MacConkey Sorbitol
SOR	Sorbitol
STEC	<i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines
Stx	Shiga-toxine

## INTRODUCTION GÉNÉRALE NÉRAL

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme l'un des plus importants groupes de pathogènes émergents. L'infection à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) s'accompagne fréquemment de diarrhée sanglante. Le tableau clinique peut se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique parfois mortel, notamment chez les enfants en bas âge, ou d'un purpura thrombotique thrombocytopénique chez l'adulte. Le sérotype le plus communément retrouvé en clinique humaine est O157:H7 mais d'autres sérogroupes tels que O103, O26 ou O111 sont de plus en plus incriminés lors d'épidémies à EHEC. Pendant les années 80, la plupart des infections à EHEC étaient associées à la consommation de denrées d'origine animale. L'épidémiologie des infections à EHEC a considérablement changé depuis ces dix dernières années, et l'ingestion de légumes et fruits contaminés ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine.

Depuis 1982, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ou VTEC selon l'ancienne dénomination) ont été à l'origine de nombreux cas d'infections humaines à travers le monde, essentiellement consécutives à la consommation d'aliments contaminés qui sont soit des denrées alimentaires directement liées au réservoir animal de STEC, soit des produits qui peuvent être en contact direct ou indirect avec des fèces animales et consommés crus ou cuits.

Les principaux aliments déjà incriminés dans la survenue d'infections à STEC sont :

- ✓ les produits carnés, principalement la viande de bœuf, la viande d'agneau (Werber *et al.*, 2007), la viande de cerf (Rabatsky-Ehr *et al.*, 2002; Keene *et al.*, 1997), les produits à base de porc (Stevenson and Hanson, 1996; Belongia *et al.*, 1991) et des produits acides et fermentés comme le salami (Williams *et al.*, 2000; Tilden *et al.*, 1996), et la saucisse fermentée (Werber *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2001; Paton *et al.*, 1996).
- ✓ les produits laitiers, yaourt, lait, fromages au lait cru.
- ✓ les légumes consommés crus, salades (Food Safety Network, 2006; Wachtel *et al.*, 2002), radis, mélange de divers légumes crus, graines germées, pousses de luzerne, melon ou épinards.
- ✓ le cidre et jus de pomme non pasteurisé, fabriqués à partir de fruits tombés au sol et non lavés (Tamblyn *et al.*, 1999; Besser *et al.*, 1993).

Ainsi aux États-Unis, entre 1982 et 2002, les aliments responsables d'épidémies d'infection à *E. coli* O157 étaient des produits à base de viande de bœuf (41%), des fruits et légumes (21%), des produits laitiers (4%) et d'autres aliments (Rangel *et al.*, 2005).

Avant d'exposer les résultats de cette étude « Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), en France et importance de l'acido-résistance des souches », objet du mémoire expérimental, il convient de replacer ce travail dans son contexte scientifique général développé dans les deux premiers chapitres de ce mémoire.

# CONTEXTE SCIENTIFIQUE GÉNÉRALE

## CHAPITRE 1

### GÉNÉRALITÉS RELATIVES AUX *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

Cette première partie a pour objectif de décrire les caractères généraux de l'espèce *Escherichia coli* et d'illustrer l'histoire évolutive des STEC à travers l'acquisition de divers facteurs de virulence, tels que les Shiga-toxines Stx1 et/ou Stx2. Les mécanismes d'action de ces facteurs de virulence, les troubles cliniques associés ainsi que les épidémies causées par les EHEC sont également exposés dans cette première partie.

#### 1 Classification taxonomique des STEC

##### 1.1 Caractères généraux de l'espèce *E. coli*

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les genres appartenant à cette famille, tels que *Salmonella* ou encore *Shigella*, sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990).

Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant de les différencier (Grimont, 1987) (Tableau 1).

*E. coli* a été décrite pour la première fois en 1885 dans des selles de nourrissons par l'Allemand Theodor Escherich. Son nom actuel a cependant été proposé en 1919 pour reclasser une espèce préalablement connue sous les noms de « *Bacterium coli commune* », de « *Bacillus coli* » ou de « *Bacterium coli* » (Grimont, 1987). C'est un microorganisme commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) (Greatorex and Thorne, 1994). *E. coli* colonise le tractus gastro-intestinal de l'Homme dès les premières heures de la naissance et persiste dans le côlon pratiquement toute la vie. Ce microorganisme représente près de 80% de la microflore commensale anaérobie facultative de ce segment du tube digestif (Ghebru, 1988) et assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse.

A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermo tolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (e.g. *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7...).

Par ailleurs, bien que la majorité des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl *et al.*, 1989)

très diverses chez l'homme. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont la colonisation des muqueuses, éventuellement l'invasion des cellules, la multiplication, l'évasion des défenses de l'hôte et les dommages à l'hôte. La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche, les modes d'infection et les signes cliniques de l'infection, constitue un moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de pathotype ou pathovar.

## 1.2 Classification en pathotypes des *E. coli* responsables de troubles intestinaux

Divers chercheurs ont réussi à mettre en évidence l'existence pour les souches pathogènes de propriétés particulières, dites de virulence, directement ou indirectement reliées à leur pouvoir pathogène. Ces propriétés permettent aux bactéries de coloniser les surfaces muqueuses de l'hôte, de les franchir, de résister aux défenses internes ou de produire un effet toxique sur cet hôte, avec apparition de lésions et de signes cliniques (Cooke, 1985 ; Pohl, 1993 ; Lior, 1994; Sussman, 1997 ; Wray et Woodward, 1997). En 1945, un groupe particulier de souches, aujourd'hui appelé EPEC (voir ci après), fut reconnu comme responsable de cas épidémiques de gastro-entérite chez les jeunes enfants. Depuis d'autres groupes ont été individualisés et même s'il n'existe pas de classification standardisée des différents pathotypes d'*E. coli*, chaque pathotype a reçu un nom basé sur la reconnaissance d'une propriété *in vivo* ou *in vitro*, liée directement ou indirectement aux lésions et à la clinique.

✓ **Les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC)** sont majoritairement associés à 2 syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur (ou « turista »). Les ETEC colonisent essentiellement la partie proximale de l'intestin grêle, grâce à leurs « facteurs de colonisation » (CFax et CSx) qui sont des adhésines fimbriaires (Cassels and Wolf, 1995) . Ils n'induisent pas d'altération histologique marquée de la muqueuse. Le pouvoir pathogène des ETEC s'explique principalement par la sécrétion des toxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT)(Levine, 1987).

✓ **Les *E. coli* Entéropathogènes (EPEC)** sont responsables de gastro-entérites infantiles. Ils touchent en particulier les enfants en bas âge (< 3 ans). Lors d'infections, des lésions histopathologiques particulières apparaissent, appelées lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) (Andrade *et al.*, 1989). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhésion intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions (Jerse *et al.*, 1990).

✓ **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)** sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que dans les pays industrialisés. Une adhésion agrégative en " briques empilées ", à l'origine de nécroses au pôle apical des villosités avec un œdème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse, les caractérise. Ils élaborent une entérotoxine thermostable (EASTI) et une entérotoxine thermolabile (Kaper *et al.*, 2004).

✓ **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)** sont phylogénétiquement assez proches de *Shigella* spp.(Brenner *et al.*, 1973), et leur mécanisme de pathogénie est similaire (invasion de l'épithélium



intestinal). Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus).

✓ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. Les diarrhées peuvent être aqueuses et contenir du mucus. L'expression d'une adhésine fimbriale (appartenant à la famille Afa/Dr) et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture de type Hep-2 (Cookson and Nataro, 1996; Benz and Schmidt, 1992).

✓ **Les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC)** sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique Thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley *et al.*, 1983). Les EHEC qui correspondent aux souches isolées chez les malades possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx*<sub>1</sub> codant la Shiga-toxine 1 [Stx1] ou *stx*<sub>2</sub> codant la Shiga-toxine 2 [Stx2]) (Riley *et al.*, 1983; Konowalchuk *et al.*, 1977) ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* codant le facteur d'attachement et d'effacement (Levine and Edelman, 1984) ou le gène *ehx* codant l'entérohémolysine (Karch *et al.*, 1995). L'ensemble des souches d'*E. coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC selon l'ancienne dénomination internationale [verotoxin-producing *E. coli*]). Il est important de souligner que les STEC ne sont néanmoins pas tous pathogènes pour l'homme (Figure 1).

La classification des STEC la plus utilisée par les microbiologistes est fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman (1947), et se base sur la détermination :

✓ du sérotype, identifié selon l'antigène somatique O. Plus de 180 sérogroupes O d'*E. coli* sont actuellement connus ;

✓ du sérotype, identifié au sein du sérotype sur la base des antigènes H flagellaires (56 antigènes différents) et éventuellement des antigènes K de la capsule (80 antigènes).

Cette classification permet d'obtenir, en considérant les trois antigènes O, H et K, plus de 800 000 sérotypes différents. A l'heure actuelle, seulement 2000 sérotypes environ ont été réellement isolés à ce jour. Parmi ceux-ci, *E. coli* O157:H7 est le principal sérotype responsable de pathologies chez l'homme. Néanmoins, d'autres sérogroupes (i.e. O26, O111, O145 et O103) sont de plus en plus à l'origine d'épidémies et impliqués dans des SHU à l'échelle internationale.

## 1.3 Origine évolutive des STEC

### 1.3.1 Origine des EHEC

L'évolution de la pathogénie chez *E. coli* est le résultat de l'arrivée d'éléments génétiques mobiles codant pour divers facteurs de virulence. Toutefois, la rétention et l'expression de ces facteurs de virulence dépendent étroitement du fond génétique de la cellule bactérienne dans laquelle

ils ont été introduits. Une analyse phylogénétique a récemment été réalisée sur la base de l'alignement des séquences de 6 gènes chromosomiques conservés (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, et *polB*) de 98 souches appartenant aux différents pathovars d'*E. coli* associés à des pathologies intestinales ou extra-intestinales (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Cette étude a montré notamment que les souches d'*E. coli* pathogènes, à l'origine de troubles intestinaux, appartiennent à 4 groupes phylogénétiques (A, B1, C et E) qui auraient émergé après la différenciation du groupe phylogénétique D (Figure 3). Ceci suggère que d'importantes modifications du génome d'*E. coli* ont eu lieu en ce point clé de l'évolution de l'espèce, permettant entre autres l'arrivée, le maintien, et l'expression fonctionnelle des facteurs de virulence dans l'ancêtre commun à ces 4 groupes.

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC. La plus probable serait que les EHEC soient un groupe de clones dérivant des *E. coli* Entéro-pathogènes (EPEC) (Whittam *et al.*, 1993). L'émergence des EHEC serait consécutive à l'acquisition par transfert horizontal de gènes de virulence (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae* et *ehx*). Ces gènes sont en effet localisés sur des éléments mobiles : les gènes *stx*<sub>1</sub> et *stx*<sub>2</sub> sont situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de pathogénicité LEE et le gène *ehxA* et *katP* (entérohémolysine-EHEC, KatP) sur le plasmide pO157.

Ainsi l'acquisition de gènes *stx* par deux clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures de EHEC : EHEC-1, constituée de souches O157, et EHEC-2, constituée de souches O26 et O111 (Sperandio *et al.*, 1998; Wieler *et al.*, 1997). On retrouve d'ailleurs ces 2 lignées dans l'analyse réalisée par Escobar-Paramo *et al.* (2004), où les souches d'*E. coli* O157:H7 (complexe EHEC-1) sont regroupées dans le clade E, alors que celles du complexe EHEC-2 sont distribuées au sein du groupe A (Figure 2).

### 1.3.2 Origine du clone *E. coli* O157:H7

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par (Feng *et al.*, 1998). Celui-ci est basé sur un ensemble d'événements génétiques qui auraient eu lieu chez l'ancêtre génétiquement le plus proche des EHEC O157:H7, un EPEC de sérotype O55:H7 (b-glucuronidase positive et fermentant le sorbitol) (Figure 3). Par ailleurs, l'analyse phylogénétique de Escobar-Paramo *et al.*, (2004) conforte ce modèle évolutif. En effet, toutes les souches d'*E. coli* O157:H7 analysées sont regroupées autour de la souche DEC5d de sérotype O55:H7 (Figure 2). Le clone O157:H7 aurait émergé à partir d'un ancêtre possédant l'îlot de pathogénicité LEE, il y a au moins trente mille ans, via l'acquisition du gène *stx*<sub>2</sub> vraisemblablement par transduction avec un phage ; il en a résulté l'émergence d'un clone O55:H7 *stx*<sub>2</sub>-positif. Ensuite, ce clone aurait acquis un plasmide codant des hémolysines et la région *rfb* (nécessaire à la synthèse de l'antigène O157) et plus récemment un gène phagique codant la Shiga-toxine 1 (*stx*<sub>1</sub>). Ce clone aurait perdu plus récemment la capacité à fermenter le sorbitol et à produire une activité b-glucuronidase fonctionnelle, suite à une mutation T→G en position 92 du gène *uidA* (Licence *et al.*, 2001). Ce clone aurait également acquis le plasmide de virulence pO157 (gènes *ehxA* et *katP*) donnant naissance au clone O157:H7 "sorbitol négatif" de répartition mondiale (Reid *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1998).

## 2 Facteurs de virulence des STEC

## 2.1 Les Shiga-toxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines inhibant *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (Slt) étant donné leurs homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Strockbine *et al.*, 1988; O'Brien *et al.*, 1982).

### 2.1.1 Structure des toxines Stx1 et Stx2

Toutes les souches STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines (Stx). Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70 kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. Ces toxines ressemblent par leurs structures et leurs fonctions à la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Gannon *et al.*, 1990). La sous-unité A possède une activité de type N-glycosidase qui permet l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée. Les deux sous-unités A et B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type 1-like. Cet opéron est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B.

### 2.1.2 Variants stx

Deux grandes classes de Shiga-toxine sont aujourd'hui identifiées : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Calderwood *et al.*, 1996; Strockbine *et al.*, 1986). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie vis à vis de la séquence en acides aminés de la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Strockbine *et al.*, 1988). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas traverser de la même façon la barrière de l'épithélium intestinal (Hurley *et al.*, 1999). En outre des études (Lindgren *et al.*, 1993; Wadolkowski *et al.*, 1990) ont montré que Stx2 serait 1000 fois plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que la toxine Stx1 (Louise and Obrig, 1995). Ces résultats corroborent les données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des troubles les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157:H7, produisent Stx2 (Boerlin, 1999).

Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits (Beutin *et al.*, 2007). Au sein de la classe des toxines Stx2, 11 variants (Brett *et al.*, 2003) sont à l'heure actuelle différenciés, dont les variants Stx2 NV206 et Stx2g qui ont été récemment décrits (Leung *et al.*, 2003; Bertin *et al.*, 2001). Concernant la classe des toxines Stx1, les variants sont moins divers puisqu'ils sont au nombre de 6, les plus fréquents étant Stx1, Stx1c et Stx1d. Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs (Calderwood *et al.*, 1996).

Les gènes *stx1* et *stx2* et leurs variants appartiennent à 2 clades phylogénétiques bien distincts. Certains d'entre eux ont été représentés dans la Figure 4. La séquence du variant Stx2f est de loin celle qui présente le moins d'homologie avec celle de Stx2. En outre, les séquences des variants Stx2-

NV206 et Stx2g sont proches des séquences des variants Stx2, Stx2c et Stx2d, fréquemment associés à des pathologies chez l'homme. Le variant Stx2e est quant à lui retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine (associées à l'oedème du porc).

### **2.1.3 Mécanisme d'action des toxines Stx**

Lors d'une première étape, la toxine se fixe à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- $\alpha$  (1-4)-galactose- $\beta$  (1-4)-glucosyl-céramide) (Lingwood *et al.*, 1987). Ce récepteur ne serait apparemment pas le seul impliqué dans le mécanisme d'action des Shiga-toxines. En effet, une récente étude a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 dans un système de culture d'organe *in vitro* (IVOC). Cependant, le mécanisme impliqué reste à l'heure actuelle inconnu (Schuller *et al.*, 2004). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose et subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme, exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al.*, 1999), conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire (Figure 5).

### **2.1.4 Rôle des toxines Stx dans la physiopathologie**

L'essentiel des symptômes cliniques est associé à la production de Shiga-toxines par les EHEC. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs liés à l'hôte (Paton and Paton, 1998). Après avoir traversé l'épithélium intestinal, les toxines seraient capables de diffuser par voie systémique et d'être véhiculées jusqu'aux organes cibles via la circulation sanguine, soit dans les globules rouges, soit par l'intermédiaire des polynucléaires (Figure 6) (Fernandez *et al.*, 2006). Lorsque l'on injecte à des souris, par voie intraveineuse, des Shiga-toxines, ces dernières se localisent dans l'intestin mais aussi dans la moelle épinière et le cerveau et d'une manière générale dans tous les organes possédant les récepteurs Gb3. Elles seraient responsables des thromboses observées au cours des atteintes locales et systémiques par altération des cellules endothéliales (Louise and Obrug, 1995). En effet, les cellules endothéliales vasculaires humaines, au niveau du côlon, au niveau du parenchyme rénal, et au niveau du système nerveux central, sont particulièrement riches en récepteurs Gb3, expliquant les manifestations cliniques observées (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques) (Paton and Paton, 1998). Une action directe de Stx au niveau des microvillosités des cellules épithéliales intestinales a été suggérée par des études sur des biopsies de côlons humains et de rats (Fiorito *et al.*, 2000). Ces dommages causés directement aux microvillosités pourraient être responsables de l'inhibition de la réabsorption d'eau au niveau du côlon.

Par ailleurs, d'autres études ont montré que les toxines Stx induiraient la production de cytokines par les macrophages et les monocytes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12...)(Blackburn *et al.*, 2004). Les cytokines induiraient alors la production de récepteurs Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à

l'action de Stx (Foster *et al.*, 2000). Ainsi, l'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC a été mise en évidence (Thorpe *et al.*, 2001; Hurley *et al.*, 1999). En activant la réponse inflammatoire, cette induction des récepteurs Gb3 permettrait le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, donc la dissémination systémique des toxines et favoriserait l'évolution vers un SHU. Ces phénomènes d'induction des cytokines pro-inflammatoires, qui pourraient jouer un rôle clé dans la physiopathologie, sont encore mal élucidés.

En outre, les Shiga-toxines seraient également impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, Erwert *et al.*, (2003) ont montré que Stx1 et Stx2 inhibent l'expression cellulaire du facteur anti-apoptotique Mcl-1.

## 2.2 Les facteurs d'adhésion intime et le facteur d'attachement et d'effacement

- *Les fimbriae ou adhésines bactériennes*

Les bactéries produisent leur propre récepteur spécifique qui est injecté dans la cellule épithéliale hôte par le moyen d'une seringue moléculaire. Les fimbriae ou adhésines bactériennes produisent ensuite un attachement intime entre la bactérie et les récepteurs de la cellule. L'adhésion aux cellules épithéliales est un préalable au développement de nombreuses pathologies. Cette adhésion se fait par l'intermédiaire d'un ligand bactérien appelé adhésine qui interagit avec un récepteur sur la cellule eucaryote. Les adhésines sont le plus souvent des lectines pouvant reconnaître des résidus sucrés portés par des glycoprotéines ou des glycolipides. Les adhésines fimbriales sont des appendices filamenteux rigides de diamètre inférieur à celui des flagelles disposés tout autour de la bactérie et terminés par une adhésine capable de se fixer de façon spécifique à un récepteur cellulaire. Elles sont souvent situées sur l'extrémité distale du pili ou fimbriae. Cette adhésion permet, en effet, à la bactérie de résister aux défenses mécaniques (péristaltisme, miction...) et, ce faisant, de se multiplier sur place, provoquant la formation de microcolonies.

- *L'intimine*

L'intimine est une protéine d'adhésion de la membrane externe associée aux lésions d'attachement-effacement, appelée intimine, qui est codée par le gène chromosomique *eae*. L'intimine joue le rôle de cal dans les infections à EHEC et EPEC. Après l'adhésion initiale souvent lâche par les fimbriae, un signal de transduction provoque la phosphorylation des protéines des cellules hôtes augmentant la concentration intracellulaire de calcium et dinositoltriphosphate causant l'effacement des microvillosités. Il s'en suit une accumulation et une repolymérisation d'actine pour former un piédestal d'une hauteur d'environ 10 µm sur lequel les bactéries peuvent s'enchasser de façon très étroite.

- *Le mécanisme d'attachement et d'effacement*

Ce mécanisme, qui a lieu en 2 temps, l'attachement aux entérocytes puis l'effacement des microvillosités, repose sur des modifications du cytosquelette des entérocytes qui consistent essentiellement en une accumulation de microfilaments d'actine, constitutifs des microvillosités (Ismaili *et al.*, 1995), microfilaments, plus ou moins dépolymérisée dans la zone apicale du cytoplasme cellulaire en contact étroit avec la bactérie. Cette accumulation de microfilaments d'actine est induite par la phosphorylation d'une protéine cellulaire Hp 90 et sa localisation est déterminée par

la fixation d'une protéine bactérienne de 97 kDa (intimine) sur un récepteur cellulaire. L'attachement entre la cellule et la bactérie est alors très fort. Peu de temps après, il est observé une disparition des microvillosités : c'est l'effacement.

Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections.

La production des facteurs d'adhésions est dépendante de l'existence d'un système de sécrétion qui est le système de sécrétion de type III que je vais vous décrire.

### **2.2.1 Le système de sécrétion de type III**

Les gènes codant pour les protéines responsables des lésions d'attachement et effacement sont portés par l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE (locus d'effacement des entérocytes), codant un système de sécrétion de type III (Figure 7) et trois classes de gènes codant pour les protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci :

✓ Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) code une protéine de membrane externe de 94 kDa appelée intimine (Jerse *et al.*, 1991). La fonction « adhésion » de l'intimine est assurée par les 280 acides aminés situés dans le domaine C-terminal. Cette région est constituée de 2 domaines "Ig-like" assurant la reconnaissance du récepteur spécifique Tir présent à la surface de la cellule cible, ainsi que d'un second récepteur non clairement identifié à ce jour.

✓ Le gène *tir* code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce au système de sécrétion de type III où il est modifié par des kinases (Kenny *et al.*, 1997). Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (DeVinney *et al.*, 1999).

✓ Les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une « seringue » moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*, *espK*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, *espF*, *espG*, *espH* ...).

Les gènes codant pour les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de sécrétion de type III dont les gènes sont également portés par le LEE. Ce système est codé par les gènes *sep* (secretion of *E. coli* protein) et *esc* (*E. coli* secretion) (Jarvis and Kaper, 1996).

La régulation de l'expression des gènes du LEE est un mécanisme complexe qui fait intervenir une multitude de facteurs. Le principal régulateur identifié à l'heure actuelle correspond au produit du gène *ler* (LEE-encoded regulator), une protéine de 13 kDa régulant plusieurs opérons du LEE (Mellies *et al.*, 1999). Récemment, (Laaberki *et al.*, 2006) ont mis en évidence deux cascades majeures de régulation contrôlant l'expression des gènes du LEE dans la souche *E. coli* O157:H7 Sakai. Celles-ci agissent sur l'activité du promoteur du gène *ler*. La première active ce promoteur par l'intermédiaire de l'ARN non codant *dsrA* et du facteur de transcription RpoS, la deuxième réprime le

promoteur du gène *ler* par l'intermédiaire de la protéine H-NS et du régulateur spécifique du LEE, GrlA. D'autres facteurs pourraient réprimer l'expression des gènes du LEE tels que GrIR (global regulator of LEE repressor) ou le facteur Mpc (multiple point controller) (Tsai *et al.*, 2006; Lio and Syu, 2004). Au contraire, la protéase ClpXP permettrait la stimulation de l'expression des gènes du LEE à travers deux principales voies dont une serait dépendante du facteur RpoS (Tomoyasu *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la régulation du LEE fait intervenir des facteurs environnementaux (Sperandio *et al.*, 2002; Sperandio *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2000; Beltrametti *et al.*, 1999). Notamment, en situation de carence en nutriments ou lors de l'arrêt de la croissance en phase stationnaire, l'expression du gène *ler* serait stimulée et l'adhésion des cellules favorisée. De plus, l'augmentation de la synthèse du régulateur de la transcription ppGpp en présence de DksA (ARN polymérase) permettrait d'activer le promoteur du gène *ler* (Nakanishi *et al.*, 2006).

Récemment, un deuxième système de sécrétion de type III (ETT2 : *E. coli* type III secretion system 2) a été révélé après séquençage complet du génome de *E. coli* O157:H7. Cependant il semble qu'il soit incapable à lui seul de permettre la synthèse d'un système de sécrétion fonctionnel (Zhang *et al.*, 2004). Par contre, certains gènes du système ETT2 coderaient pour des protéines inhibitrices (EtrA et EivF) de la transcription des gènes du LEE.

#### Autres facteurs majeurs d'adhésion

Bien que le LEE soit prépondérant chez les EHEC, certaines souches EHEC associées à des cas de SHU sont LEE (-).

✓ Sur l'une d'entre elles, (Paton *et al.*, 2001) ont isolé un gène provenant d'un mégaplasmide et codant le facteur Saa (STEC autoagglutinating adhesin) constitué par environ 500 acides aminés. Il augmenterait de manière significative l'adhésion des cellules STEC sur lignées cellulaires de type Hep-2. La distribution de ce gène parmi des souches STEC d'origine bovine et humaine fut par la suite investiguée par (Jenkins *et al.*, 2003). Les souches *saa*<sup>+</sup> ont été détectées plus fréquemment dans les isolats STEC issus des bovins (32 sur 56) que ceux provenant de cas cliniques (8 sur 91).

✓ Iha (Iron-homologue adhesin), est une protéine de la membrane externe de 67 kDa, identifiée chez certains STEC. Elle confère un phénotype d'adhésion diffuse sur cellules HeLa aux *E. coli* O157:H7 et à certaines souches STEC *eae*-négatives telles que celles de sérotype O113:H21 (Tarr *et al.*, 2000).

✓ D'autres adhésines ont été récemment décrites dans des souches STEC ne possédant pas l'îlot de pathogénicité LEE, telles que des protéines de liaison aux immunoglobulines (EibG), des longs fimbriae polaires (Lpf (O113) par exemple) ou encore les pili type ECP (Carney *et al.*, 2006; Doughty *et al.*, 2002).

✓ Le gène chromosomique *efal* coderait un facteur d'adhésion potentiel chez les EHEC LEE-positifs (Nicholls *et al.*, 2000).

✓ Enfin, la présence de curli a été mise en évidence récemment chez certaines souches STEC (Jeter and Matthysse, 2005; Ryu *et al.*, 2004; Cookson *et al.*, 2002). Chez les *E. coli* commensaux, les curli apparaissent comme un facteur d'adhésion à large spectre, permettant la fixation des bactéries

aux surfaces inertes (sable, verre, plastiques, inox...) mais également aux surfaces des cellules végétales et animales, cependant leur implication dans les mécanismes de pathogénie chez les EHEC est encore incertaine (Kim and Kim, 2004 ; Pawar *et al.* 2005).

## 2.3 Autres facteurs plasmidiques de virulence

### 2.3.1 L'entérohémolysine

L'entérohémolysine E-hlyA a été mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin *et al.*, 1988). La protéine E-hlyA est codée par le gène *ehxA* de l'opéron plasmidique *ehxCABD* (Karch *et al.*, 1995). Ce gène présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l' $\alpha$ -hémolysine d'*E. coli* K12. C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines Rtx (Repeats in Toxin), et son mécanisme d'action est comparable à celui de l' $\alpha$ -hémolysine. L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à sa capacité à former des pores, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules (Soloaga *et al.*, 1999). Elle permettrait notamment de stimuler le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies. Cependant, l'activité de E-hlyA est moins puissante que celle de l' $\alpha$ -hémolysine ; en effet, le phénotype hémolytique des STEC se caractérise par une lyse des érythrocytes de mouton sur gélose au sang plus discrète et plus lente (Beutin *et al.*, 1997; Karch *et al.*, 1995). De plus les souches isolées chez les malades ne possèdent pas toujours ce gène, et sa présence n'est pas statistiquement corrélée au pouvoir pathogène.

### 2.3.2 La protéase EspP

Une sérine protéase EspP, capable de cliver le facteur humain V de coagulation et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénie (Brunder *et al.*, 1997). La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients.

### 2.3.3 Autres facteurs

D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la pathogénie : la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi que le système de sécrétion de type II (Burland *et al.*, 1998; Brunder *et al.*, 1996). Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC (Bonardi *et al.*, 2001; Iyoda *et al.*, 2000; Brunder *et al.*, 1996; Savarino *et al.*, 1996). Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

## 3 Pathologies humaines associées aux EHEC

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr, 1995).

### 3.1 La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli*



O157:H7 (Tarr, 1995; Griffin and Tauxe, 1991). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile (Griffin and Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (Brewster *et al.*, 1994; Griffin and Tauxe, 1991). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient (Acton and Gregorich, 1995). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée.

### 3.2 Le SHU

Le SHU touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient généralement après une diarrhée prodromique sanglante. Ce n'est qu'en 1983 que (Karmali *et al.*, 1983) établissent la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. L'incidence du SHU est de 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et de 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin and Tauxe, 1991). Le SHU post-diarrhée représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et constitue la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Le pronostic rénal est favorable dans environ 2 tiers des cas (Loirat *et al.*, 1992).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Loirat *et al.*, 1992). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre une enquête Française dans laquelle 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central (Decludt *et al.*, 2000).

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. Toutefois, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet de maintenir actuellement un taux de mortalité inférieur à 5%. Si des vomissements, de la diarrhée et des symptômes de colite persistent, une nutrition parentérale est nécessaire. Enfin lorsque l'enfant est anurique, une dialyse est indiquée, pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volémique.

### 3.3 Le PTT

Le PTT est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (Moschcowitz, 1925). Le PTT touche essentiellement l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopenie (diminution du nombre des plaquettes sanguines), une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. La diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993). L'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...) et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et

l'apparition de ce syndrome est récente (Kovacs *et al.*, 1990).

La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale.

## 4 Epidémiologie humaine des STEC

Les enfants en bas âge (<5 ans), les personnes âgées (>65 ans) et les personnes ayant pris récemment un traitement antibiotique sont plus susceptibles de développer la maladie (Griffin *et al.*, 1990). Néanmoins, toute personne est potentiellement à risque et peut développer une diarrhée, voire un SHU. En effet, lors de l'épidémie survenue dans le sud de la France en octobre 2005 suite à la consommation de steak haché contaminé par *E. coli* O157:H7, une personne de 42 ans, sans antécédent pathologique avéré, a été infectée. Par ailleurs, d'autres personnes peuvent être considérées à risque du fait de leur exposition fréquente à un réservoir animal de STEC, au travers de leurs activités professionnelles (i.e. éleveurs...) ou de leurs loisirs (enfants en classe verte, ferme pédagogique...).

En France, la surveillance des infections à STEC est basée sur celle des SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Elle repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires et est coordonnée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est proche de celle observée dans d'autres pays européens et s'échelonne à moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans.

### 4.1 Principaux modes de transmission

#### 4.1.1 Transmission alimentaire

Impliquée dans la moitié des épidémies à EHEC, elle est la principale source de contamination humaine.

✓ Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre d'infections à *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozand and Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Baranyi and Roberts, 1995). La viande d'autres animaux de boucherie, ou de volailles a également été mise en cause (Paton *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1994; Doyle, 1991; Griffin and Tauxe, 1991; Orskov *et al.*, 1987). Les STEC sont généralement introduits dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. Le processus de dissémination du pathogène se poursuit ensuite au niveau des étapes de transformation des viandes.

✓ Le lait et les produits laitiers non pasteurisés ont également été à l'origine d'épidémies (Allerberger *et al.*, 2001; Casenave *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993). La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait par les STEC. Néanmoins, une étude menée *in vitro* a

montré l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157:H7 (Matthews *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une source mammaire de contamination du lait.

✓ Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons, etc) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol.

#### **4.1.2 Transmission hydrique**

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1997 et 2004, le système de surveillance des Etats-Unis rapportait que 6% des épidémies d'origine hydrique étaient liées aux EHEC (Dziuban *et al.*, 2006; Blackburn *et al.*, 2004; Barwick *et al.*, 2000) contre 3% au Royaume-Uni (Gough *et al.*, 2006).

✓ La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection (Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Mannix *et al.*, 2005; Holme, 2003). Depuis ces dix dernières années, le nombre d'épidémies associées aux réseaux publics d'eau potable a nettement diminué, notamment grâce à la mise en place de mesures préventives et curatives appropriées. Dans le cas des réservoirs d'eau dédiés à une consommation privée, ces mesures ne sont pas toujours appliquées. Du fait de leur insalubrité et de leur localisation, en aval de terres agricoles pâturées par des ruminants ou fertilisées par les effluents d'élevages, ces réservoirs d'eau peuvent être contaminés par les eaux de percolation et/ou de ruissellement, notamment à la suite d'importants événements pluvieux. Une enquête épidémiologique a pointée l'eau privée comme facteur de risque de contamination par les STEC (Chalmers *et al.*, 2000).

✓ L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle (Paunio *et al.*, 1999; Ackman *et al.*, 1997; CDC, 1996; Cransberg *et al.*, 1996; Keene *et al.*, 1994) ou dans une piscine (Friedman *et al.*, 1999; Hildebrand *et al.*, 1996; Brewster *et al.*, 1994) a souvent été incriminée. Aux Etats-Unis, les épidémies à *E. coli* O157:H7 d'origine hydrique sont principalement associées aux eaux issues de lacs ou rivières, en raison de la sensibilité des souches, notamment à la chloration des eaux de piscines (Craun *et al.*, 2005).

#### **4.1.3 Transmission inter-humaine**

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Stephan and Untermann, 1999; Griffin, 1995). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades.

De plus, cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Sugiyama *et al.*, 2005; Al-Jader *et al.*, 1999; Boudailliez *et al.*, 1997; Swerdlow and Griffin, 1997; Allaby and Mayon-White, 1995; Belongia *et al.*, 1993), les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) et dans les centres psychiatriques (Pavia *et al.*, 1990). Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles (Ludwig *et al.*, 1998) et dans les

hôpitaux (Bolduc *et al.*, 2004; Karmali *et al.*, 1999). La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors d'*E. coli* hémorragique et de 31 jours lors de SHU (Bielaszewska *et al.*, 1997).

#### **4.1.4 Transmission par le contact avec les animaux de ferme et leur environnement**

La transmission d'*E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques (O'Brien *et al.*, 2001a; Beutin *et al.*, 2000; Trevena *et al.*, 1999; Coia, 1998; Kassenborgh *et al.*, 1998; Parry and Salmon, 1998; Renwick *et al.*, 1994) mais aussi lors d'épidémies (Crump *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 1999; Milne *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 1994). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux (Evans *et al.*, 2000). Par exemple, chez les éleveurs anglais, la séroprévalence à O157 varie de 1,6% à 5% (Chalmers *et al.*, 1999). Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals (Crampin *et al.*, 1999) ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden *et al.*, 2002). En Ecosse, du sol souillé a été impliqué dans 11% des infections environnementales à *E. coli* O157:H7 (Strachan *et al.*, 2006).

## **4.2 Principales épidémies**

Les principales épidémies survenues depuis 1995 sont répertoriées dans les Tableaux 2 et 3. Les EHEC constituent la cause majeure de diarrhée hémorragique et de SHU dans les pays à climat tempéré (Bonardi *et al.*, 2001; Ackers *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). En France, le taux d'incidence du SHU est d'environ 0,7 pour 100 000 enfants âgés de moins de 15 ans (soit 76 cas notifiés) et de 2,1 pour 100 000 enfants âgés de moins de 2 ans (Haeghebaert *et al.*, 2003). Il existe une variation saisonnière marquée de l'infection, avec une recrudescence des épidémies d'origine environnementale pendant la période estivale (Tozzi *et al.*, 2001). Le sérotype le plus fréquemment mis en cause lors d'épidémies est O157:H7 (Meyer-Broseta *et al.*, 2001; Siegler, 1995; Bitzan *et al.*, 1993). Les Etats-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les pays où la fréquence d'isolement du sérotype O157:H7 est la plus importante. Ce sérotype a toutefois été décrit dans de multiples épidémies survenues dans différents pays européens, dont la France, et également en Australie, Argentine, Afrique du sud, Thaïlande, Israël, Chine et Japon (Espie *et al.*, 2008; Doorduyn *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2006; Soderstrom *et al.*, 2005; Paton *et al.*, 1996; Arocha *et al.*, 1992; Griffin and Tauxe, 1991; Lopez *et al.*, 1989). En France, il est impliqué dans 86% des cas de SHU (Haeghebaert *et al.*, 2003). Toutefois, les sérotypes autres que O157:H7 ont très certainement été sous-estimés. La communauté scientifique met régulièrement en évidence des STEC non-O157:H7 chez les malades atteints de SHU ou d'*E. coli* hémorragique avec en ordre décroissant de fréquence les sérotypes O111:H- et O111:H2, O26:H11 et O26:H-, et O103:H2 et O103:H-. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive et n'indique que les sérotypes majeurs isolés chez les malades. Ainsi d'autres sérogroupes peuvent être impliqués tels que O55, O82, O105, O113, O145, O171, etc (Gerber *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 1996; Tarr, 1995; Caprioli *et al.*, 1994), mais leur fréquence réelle est difficile à estimer du fait de méthodes de détection le plus souvent inadaptées ou d'absence de recherche (Griffin *et al.*, 2000).

Pendant les années 80, la plupart des infections à EHEC étaient essentiellement associées à la

consommation de denrées d'origine animale. L'épidémiologie des infections à EHEC a considérablement changé depuis ces vingt dernières années, et l'ingestion de végétaux ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine. Ceci s'explique sans doute par (i) une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination lors d'une épidémie à EHEC, (ii) une multiplication des élevages bovins intensifs, (iii) et par une modification du régime alimentaire chez l'homme, avec une consommation accrue de fruits et légumes crus dans les pays développés. En Ecosse, entre 1994 et 2003, sur 35 épidémies à *E. coli* O157:H7 identifiées, 19 (54%) étaient associées à des sources environnementales de contamination (Strachan *et al.*, 2006). De même aux Etats-Unis, 48% des épidémies survenues entre 1982 et 2002 n'étaient pas d'origine alimentaire, avec une nette augmentation des épidémies d'origine environnementale après 1995 (Rangel *et al.*, 2005).

## **5 Epidémiologie environnementale et alimentaire de Escherichia coli O157:H7 et des STEC**

En 1982, deux épidémies de colites hémorragiques dues à une infection à *E. coli* O157:H7 étaient rapportées pour la première fois, aux Etats-Unis (Riley *et al.*, 1983). Ces épidémies étaient associées à la consommation de hamburgers, d'où le nom populaire de « maladie du hamburger » repris à l'époque par la presse américaine.

Ces vingt dernières années, les connaissances sur la complexité de l'épidémiologie et de l'écologie de ce pathogène ont évolué. Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources d'infections à STEC. Ainsi, il paraît évident que *E. coli* O157:H7, et plus généralement les STEC, peuvent se transmettre du réservoir animal à l'homme via les denrées alimentaires, l'eau, l'environnement et les contacts directs avec les animaux.

### **5.1 Portage et excrétion de Escherichia coli O157:H7 et des STEC chez les bovins**

Cette partie traite du portage et de l'excrétion de *E. coli* O157:H7 et des STEC uniquement chez les bovins. Les données concernant les autres ruminants (notamment les ovins et caprins) n'ont pas été détaillées pour des raisons de concision.

Le tableau 4 présente quelques données de prévalence du portage des STEC, après recherche des gènes *stx* dans les matières fécales, chez les bovins laitiers et/ou à viande de différents pays.

Par ailleurs, il est intéressant de citer quelques études faisant état du pourcentage de cheptels contaminés par les STEC (tous sérotypes confondus). Fremaux *et al.* (2006) ont montré que les STEC étaient présents dans 91% des troupeaux de bovins laitiers testés (n=115) en France, et Blanco *et al.* (1996) ont reporté des résultats sensiblement analogues en Espagne (la présence de STEC ayant été montrée dans 84% des troupeaux testés).

Concernant le sérotype *E. coli* O157:H7, Meyer-Broseta *et al.*, (2001) ont réalisé la synthèse de 26 études épidémiologiques effectuées aux Etats-Unis et en Europe. Pour les Etats-Unis, la prévalence en terme de troupeaux atteints oscillait de 0-2 % jusqu'à 22 %, avec une moyenne de 7 à

8 % pour les troupeaux laitiers. Une seule enquête concernait des troupeaux à viande dans laquelle 4 des 25 cheptels étudiés se sont révélés positifs. Les études réalisées en « feedlots ou factory farming », i.e. concept ou système d'élevage industriel développé essentiellement en Amérique du nord pour l'engraissement des animaux présentent des valeurs de prévalence beaucoup plus élevées (61% des troupeaux testés se sont révélés positifs). En Europe, les valeurs notées pour la prévalence de *E. coli* O157:H7 sont beaucoup plus faibles, entre 0 et 3 % des troupeaux étudiés étaient positifs.

Cette même étude montre, qu'aux Etats-Unis, la prévalence de *E. coli* O157:H7 en terme d'animaux atteints est de moins de 1,5 % sur des bovins de moins de 8 semaines (âge du sevrage). Entre 8 semaines et 4 mois, elle augmente de 1,8 à 5 %. La prévalence décroît ensuite avec l'âge, comme cela a été montré par une étude sur des génisses âgées de 4 à 24 mois grâce à des prélèvements mensuels montrant une prévalence moyenne de 2,3 %. Les bovins adultes laitiers ou à viande excrètent *E. coli* O157:H7 avec une plus faible fréquence, inférieure à 0,7 %.

Enfin, une étude menée entre 1995 et 1996 dans 4 élevages laitiers du Wisconsin (Etats-Unis) a permis le suivi de l'excrétion de souches de *E. coli* O157:H7 chez des bovins (Shere *et al.*, 1998). Chez un même animal excréteur, elle peut durer pendant 4 mois l'hiver et seulement 1 mois l'été. Le taux d'excrétion semble, qui plus est, plus important en été qu'en hiver et la quantité de *E. coli* O157:H7 dans les fèces varie alors entre  $2.10^2$  et  $9.10^4$  unité formant colonie (UFC/g) par gramme de matière fécale. L'étude des profils de restriction par électrophorèse en champ pulsé montre qu'une même souche peut persister dans l'environnement d'un troupeau pendant plus de 2 ans.

## 5.2 Contamination environnementale

La contamination fécale est la principale source de contamination de l'environnement et l'apport régulier de STEC à travers les fèces des animaux est en partie responsable de la persistance de ces pathogènes dans l'environnement.

En effet, l'épandage de fumiers ou de lisiers, à des fins de fertilisation des sols, peut être un vecteur important de contamination du sol, des cultures et des eaux, profondes ou de surface. En outre, les STEC semblent pouvoir survivre et conserver leur capacité de virulence (production de Stx1 et/ou Stx2) après survie pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (abreuvoir, fumier et lisier) (Wang *et al.*, 1996 ; Fremaux *et al.*, 2007a), dans les sols (Fenlon *et al.*, 2000) et dans les eaux (Wang et Doyle, 1998). Cette réelle capacité de survie et de virulence dans différentes conditions à été démontré et est illustrée dans les deux exemples cités ci-dessous.

Le premier concerne une infection par *E. coli* O157:H7 survenue aux Etats-Unis chez un patient végétarien consommant les produits de son jardin. Il a été démontré que ce jardin était régulièrement fertilisé avec du fumier de bovins dont on a étudié la sérologie et montré qu'elle était positive avec des anticorps anti O 157 (Cieslak *et al.*, 1993). Le deuxième exemple fait état d'un foyer d'infection par *E. coli* O157:H7 chez des scouts ayant campé dans un pré où des moutons avaient pâturé 6 jours dans de mauvaises conditions météorologiques (pluie, sol boueux). La question était de savoir si *E. coli* O157:H7 avait pu survivre suffisamment longtemps dans le sol pour contaminer les campeurs scouts. Pour répondre à cette question un essai de modélisation a été réalisé dans des conditions expérimentales (Ogden *et al.*, 2002; Strachan *et al.*, 2001). Les résultats de cette modélisation ont

montré qu'à 5°C, le temps de réduction décimal de *E. coli* O157:H7 dans du fumier ou du lisier appliqué sur le sol était estimé à  $16 \pm 2$  jours. La quantité de sol ingérée par les enfants avait été estimée entre 30 et 200 mg/24 heures. Trois semaines après l'épisode décrit chez les scouts, *E. coli* O157:H7 était retrouvé dans 100 % des prélèvements de fèces d'animaux analysés et 60 % des prélèvements de sol, à des taux allant de 3 à  $10^3$  UFC/g pour les fèces et de l'ordre de 3 UFC/g pour le sol.

### **5.3 Présence dans les différentes filières agro-alimentaires**

Plusieurs épidémies liées à STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale. La viande de bœuf, le lait et les produits laitiers, les jus de fruits ainsi que les légumes crus font partie des aliments actuellement majoritairement incriminés. Le risque de contamination des denrées d'origine animale est, il est vrai, fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées à la ferme (notamment pendant la traite), en abattoir et dans les ateliers de transformation. Cette partie évoque les circuits de contamination dans ces filières et présente également des données de prévalence de *E. coli* O157:H7 et des STEC dans chacune d'entre elles.

#### **5.3.1 Données générale concernant la filière viande bovine**

De nombreuses épidémies d'infection à *E. coli* O157:H7 ont été associées à la consommation de viande de bœuf ou de préparations à base de viande de bœuf et notamment récemment en France avec l'épidémie survenue dans le sud-ouest en octobre 2005. Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer le mode de contamination des denrées alimentaires. Les études menées au niveau de la filière viande ont eu pour but de mettre en évidence le lien entre le portage fécal des animaux et la contamination des carcasses, des viandes et produits à base de viande commercialisés. Les tableaux 5 et 6 présentent des données générales quant aux fréquences observées de produits contaminés, viande de bœuf crue et steak haché, dans différents pays.

*E. coli* O157:H7 et les autres STEC sont introduits dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. La contamination des carcasses peut avoir lieu principalement aux moments du dépouillement des cuirs, potentiellement souillés par le pathogène, et de l'éviscération, le pathogène ayant pour réservoir principal le tube digestif des bovins. D'autre part, une inter-contamination des carcasses sur la chaîne d'abattage peut également se produire via les outils utilisés par les opérateurs. Le processus de dissémination du pathogène se poursuit ensuite au niveau des étapes de transformation des viandes, notamment par exemple lors de la fabrication de viande hachée où les carcasses contaminées désossées et découpées (minerais) peuvent ensuite après broyage contaminer un ou plusieurs lots de steaks hachés.

#### **5.3.2 Données générale concernant la filière lait et produits laitiers**

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis plusieurs années. La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la

contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite, même si certaines études suggèrent l'existence possible d'une voie de contamination du lait avant la traite (Matthews *et al.*, 1997).

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou des autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles, étant donné la difficulté (due au facteur de dilution) de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange. Le Tableau 7 fait état de quelques fréquences observées en Europe, de laits et produits laitiers contaminés par des STEC.

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 dans le lait, une étude américaine a montré que, sur 268 prélèvements de lait cru effectués, seuls 2 échantillons (0,75%) se sont avérés contaminés par *E. coli* O157:H7 (Murinda *et al.*, 2002). En outre en Europe, une étude anglaise (Mechie *et al.*, 1997) a révélé que, sur 329 prélèvements de lait issus du tank, aucun ne présentait une sérologie positive pour *E. coli* O157:H7.

### **5.3.3 Données générale concernant la filière végétale (légumes et fruits)**

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination de l'homme par les STEC et en particulier par *E. coli* O157:H7. Différents végétaux ont été mis en cause comme, par exemple, de la laitue (Hilborn *et al.*, 1999; Ackers *et al.*, 1998), des pommes de terre (Morgan *et al.*, 1988) ou encore des pousses de radis blanc (Taormina *et al.*, 1999). Les causes de contamination des cultures maraîchères mises en avant sont, le plus souvent, l'irrigation de ces cultures par de l'eau elle-même contaminée et l'épandage d'effluents d'élevage contaminés par les STEC.

Aux Etats-Unis, une épidémie liée à la consommation d'épinards contaminés par *E. coli* O157:H7 a causé tout récemment la mort de trois personnes (Jay *et al.*, 2007). Il convient de noter que sur les 199 personnes infectées, 141 (71%) étaient des femmes et 22 (11%) des enfants de moins de 5 ans. Le pourcentage, élevé, recensé pour les femmes est probablement dû à leurs habitudes de consommation.

Enfin toujours aux Etats-Unis, du cidre non pasteurisé a également été la cause de plusieurs épidémies (Besser *et al.*, 1993 ; Cody *et al.*, 1999), et, une fois encore, l'origine d'une contamination fécale par des bovins a été suspectée.

Un état des lieux de la prévalence des STEC et du sérotype O157:H7 dans la filière « fruits et légumes » ne sera pas établi dans cette partie, étant donné le faible nombre de données disponibles dans la littérature.

A noter que les différences de prévalence de *E. coli* O157:H7 et des STEC qui existent entre les pays sont certes dues au lieu même de l'investigation, mais peuvent également être liées aux méthodes d'échantillonnage et de détection utilisées.

## **5.4 Conclusion**

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémie ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC. La figure 8 présente les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme. A l'heure actuelle, les 4



principales voies d'infection à EHEC sont l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission inter-humaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

En conclusion, il est important de garder en mémoire que les STEC ne sont pas tous pathogènes pour l'homme. Ils se caractérisent par la production de Shiga-toxines: Stx1 et/ou Stx2 ; Stx2 étant une toxine plus virulente que Stx1. De nombreux variants Stx1 et surtout Stx2 ont été identifiés. L'acquisition des facteurs de virulence par *E. coli* s'est faite essentiellement par des mécanismes de transferts génétiques horizontaux, avec un rôle important des bactériophages. Les toxines se fixent sur les récepteurs Gb3 présents principalement à la surface des cellules endothéliales vasculaires, puis entraînent la mort cellulaire expliquant ainsi les manifestations cliniques (complications rénales ou neurologiques). L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est de 0.7 cas pour 100000 enfants de moins de 15 ans. Depuis une dizaine d'années, l'épidémiologie des STEC a changé et l'ingestion de fruits et légumes crus, ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en pathologie humaine.

---

## CHAPITRE 2

### ÉPIDÉMIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES STEC DANS DES ALIMENTS

Les bactéries sont directement en contact avec le milieu extérieur et subissent les changements de l'environnement. Pour s'adapter et survivre, une bactérie doit être capable de moduler l'expression de certains gènes. L'un des paramètres fondamental de l'environnement est son pH. Les changements de pH peuvent parfois être extrêmes, comme par exemple, lorsque les entérobactéries ingérées pénètrent dans l'estomac où le pH est voisin de 2, avant de rejoindre leur véritable niche écologique, l'intestin. La réponse au stress acide de *E. coli* O157:H7 fait appel à des mécanismes de régulation complexes dont certains restent à ce jour non élucidés.

#### 1 Epidémie liées à des aliments acides contaminés par des STEC

La survie et/ou la croissance du seul sérotype *E. coli* O157:H7 a fait l'objet de nombreuses études dans différentes matrices alimentaires. La viande de bœuf insuffisamment cuite constitue la principale source de contamination par le pathogène. Plusieurs études ont également rapporté que *E. coli* O157:H7 pouvait survivre dans les produits carnés fermentés (Riordan *et al.*, 1998; Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1992), les produits laitiers fermentés (Dineen *et al.*, 1998; Massa *et al.*, 1997), le jus de pomme (Zhao *et al.*, 1993), la mayonnaise (Zhao and Doyle, 1994), les sauces pour salades (Skandamis and Nychas, 2000) et le vinaigre (Tsujihata *et al.*, 1998). L'analyse des épidémies (Tableau 8) a permis de pointer le fait que ni l'acidité, ni certain procédé de type fermentation ne

permettait d'hygiéniser les aliments contre les STEC.

## 1.1 Présentation détaillée de certaines épidémies liées aux aliments acides

### 1.1.1 Aliments d'origine végétale

Le jus de pommes non-pasteurisé a un pH acide compris entre 3 et 4. Ce pH relativement bas a laissé longtemps les hygiénistes penser qu'il était incompatible avec la croissance voire la survie des bactéries pathogènes impliquées dans les toxi-infections alimentaires. Pourtant comme le montre le tableau 8, le jus de pommes a été associé à plusieurs épidémies. La plus importante d'entre elles, liée à *E. coli* O157:H7, a eu lieu en 1996 et a touché plus particulièrement l'Ouest des États-Unis et le Canada. Au total, 70 personnes ont été malades, 14 d'entre elles ont développé un SHU et 1 personne est décédée suite à la consommation de jus de pomme non pasteurisé. Les investigations menées lors de cette épidémie, n'ont pas permis de pointer avec certitude, les circonstances de la contamination des pommes ayant servi de matières premières pour ce jus de fruit. Toutefois, les pommes ayant servi à la fabrication de ce jus de fruit, n'avaient pas été épluchées, étaient insuffisamment lavées et avaient été ramassées à même le sol après qu'un cheptel bovin soit venu paître dans le verger. Ainsi, la piste d'une contamination des pommes par ces excréments d'animaux domestiques ou sauvages a été envisagée, piste qui par ailleurs a été démontrée lors d'épidémies postérieures (Besser *et al.*, 1993).

### 1.1.2 Aliments d'origine animale

#### 1.1.2.1 Aliments carnés

##### a) Contamination par *E. coli* O157:H7

En Novembre 1994 (Tilden *et al.*, 1996), 17 personnes sont tombées malades suite à l'ingestion de salami fermenté et séché, prétranché, commercialisés à Washington et en Californie. Le salami fermenté et séché, représente une classe de produits traditionnels, dans laquelle de la viande hachée crue est conservée grâce à un processus de fermentation et de séchage. Le pH bas généré par le processus de fermentation et le taux d'activité de l'eau ( $a_w$ ) faible généré par la phase de séchage et de maturation, combinés avec l'effet inhibiteur du sel, du nitrate, des aromates et épices créent un environnement tout à fait hostile à la plupart des bactéries pathogènes. Ces produits peuvent être consommés en l'état et en conséquence ne subissent aucune cuisson avant leur consommation. Suite à cette épidémie, *E. coli* O157:H7 a été isolé dans du salami encore emballé directement collecté dans les supermarchés ayant approvisionné les 2 états (Washington et de Californie). Il y a eu identité totale démontrée par électrophorèse en champ pulsé entre les souches isolées des malades et celles isolées du salami. Plus récemment, en 2002, une épidémie d'envergure associée à de la saucisse fermentée contaminée par *E. coli* O157:H7 a été identifiée dans la région sud de la Suède : 39 cas d'infection ont été répertoriés et parmi eux, 12 cas de très jeunes enfants ayant développé un syndrome hémolytique et urémique (Sartz *et al.*, 2008). Dans ce cas également, il y a eu la preuve de la relation clonale entre les souches isolées de la saucisse fermentée et celles isolées des selles des malades. La viande de bœuf, matière première de fabrication de ces saucisses a été suspectée comme

étant la source de l'infection. La survie et la croissance du pathogène ont été expliquées par un démarrage retardé de la fermentation, une absence totale de traitement thermique et un maintien au froid insuffisant. D'une manière générale, pour les autres épidémies ayant impliqué des produits carnés fermentés, il a été démontré soit une contamination par le pathogène de la viande matière première, soit une période de séchage insuffisante et un pH insuffisamment bas. Ainsi, pour assurer la sécurité sanitaire de ces produits carnés fermentés, différents pays dont les États-Unis, l'Australie et le Canada, ont mis en place des mesures renforcées de contrôle, intégrant notamment comme support d'aide à la gestion, la microbiologie prévisionnelle qui permet de déterminer la survie et la croissance de différents pathogènes dont *E. coli* O157:H7 dans ces produits fermentés carnés (Anon., 1999; Reed, 1995).

Ainsi, depuis 1996, le Département de l'Agriculture Américain exige que les producteurs de salami utilisent un processus de fabrication visant à diminuer le nombre de *E. coli* O157:H7 de 5 log décimaux. Ils peuvent pour cela, agir soit sur le processus de fermentation soit sur le séchage.

#### **b) Contamination par des STEC non O157**

Même si le sérotype O157:H7 est un sérotype majeur dans l'émergence d'épidémies d'envergures, il n'en est pas moins vrai que d'autres sérogroupes, non O157 ont été cités dans des épidémies liées à des produits carnés fermentés. Ainsi, une épidémie ayant mis en cause des saucisses fermentées séchées contaminées par *E. coli* O111 a été identifiée à Adélaïde, région sud de l'Australie entre janvier et février 1995 avec 21 SHU identifiés. La viande, matière première utilisée pour fabriquer ces saucisses était issue de moutons, porcs et agneaux, travaillée dans une petite entreprise familiale, qui fabriquait par ailleurs du salami. Les inspections sanitaires pratiquées chez le fabricant n'ont pas été suffisantes pour déterminer l'origine de la viande qui était contaminée. Néanmoins, des erreurs graves lors de la fabrication ont été relevées, notamment l'absence totale d'utilisation de ferments lactiques, l'absence totale de surveillance de chute du pH pendant les premières phases du processus de fermentation, et enfin l'absence de contrôle de l' $a_w$  en fin de processus de séchage. Ainsi, les caractéristiques physico-chimiques pH,  $a_w$  des saucisses produites étaient tout à fait compatibles avec la survie voire la croissance du pathogène *E. coli* O157:H7 apporté par les viandes matières premières.

Plus récemment, au Danemark en 2007, une épidémie liée à des saucisses de bœuf contaminées par *E. coli* O26:H11 a été décrite. Cette épidémie a fait 20 malades dont 3 SHU, la majorité des malades étant composée d'enfants (Ethelberg *et al.*, 2007). Des études de traçabilité ont permis de retrouver le lot de viande de bœuf contaminé, de rappeler et de détruire les saucisses contaminées. Les inspections sanitaires menées dans l'usine de fabrication de ces saucisses de bœuf n'ont pas pu montrer, quant à elles, de manquements soit d'hygiène soit des insuffisances de fermentation ou de séchage.

Tout aussi récemment, mais cette fois-ci en Norvège, se sont des saucisses de mouton séchées et fermentées contaminées par *E. coli* O103:H25 qui ont été à l'origine de 6 cas de SHU tous affectant de très jeunes enfants (Schimmer *et al.*, 2008). L'usine de fabrication a également été l'objet d'une inspection sanitaire minutieuse sans qu'il ait pu être déterminé de fautes ou d'erreurs technologiques pouvant être associées soit à l'introduction soit à la multiplication du pathogène. En

revanche, il a été possible, grâce à la traçabilité, de remonter la filière suivie par la viande de mouton congelée et de retrouver l'abattoir ou les animaux avaient été abattus ainsi que les éleveurs de moutons (4 fermes). Pour cette épidémie également, il a pu être démontré un lien de clonalité entre les souches excrétées à l'échelon d'une de ces 4 fermes et les souches isolées à la fois dans les saucisses fermentées de mouton et les selles des jeunes enfants victimes d'insuffisance rénale.

### **1.1.2.2 Fromages**

#### **a) Contamination par *E. coli* O157:H7**

Les épidémies, liées aux produits laitiers, n'ont concerné, que les fromages ou lait fermenté uniquement à base de lait cru ou de lait insuffisamment chauffé. La France a déploré 2 épidémies associées à des fromages au lait cru. En Juillet 2004 (Espié *et al.*, 2006a) ont été identifiés des cas groupés familiaux avec 3 malades dont 2 SHU (les 2 enfants en bas âge), qui avaient tous 3 consommé du fromage frais au lait cru de chèvre produit par un éleveur local qui vendait ses produits à la ferme. Il y a eu comparaison des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées dans les selles des 2 enfants et également des souches trouvées à l'échelon de l'exploitation et isolées à partir du contenu rectal d'une vache et d'une chèvre. Le profil obtenu par électrophorèse en champ pulsé de la souche de la chèvre était identique au profil des souches isolées chez les enfants. Les enquêtes menées chez l'éleveur par les services de la Direction des Services Vétérinaires (DSV) ont montré une hygiène de la production du lait défectueuse avec plus particulièrement une absence totale de nettoyage des mamelles avant la traite, ainsi qu'une absence de nettoyage et désinfection du matériel dédié à la traite. D'autre part, l'hygiène de l'étable était mauvaise (litières non changées, abreuvoirs à même le sol et souillés de matières fécales et une eau sale etc...).

#### **b) Contamination par des STEC non O157**

Plus récemment, toujours en France, ce n'est pas le sérotype O157:H7 mais le sérotype O26 qui a fait parler de lui avec 9 cas d'enfants victimes de SHU ayant tous consommé du Camembert au lait cru commercialisé en Normandie. Là aussi, les souches isolées dans les selles des enfants ont été les mêmes que celles retrouvées dans un lot de Camembert au lait cru incriminé. Les investigations menées à l'échelon de la fromagerie n'ont révélé aucune anomalie particulière. Au contraire, l'hygiène générale était parfaitement respectée. Par contre, en amont, chez 4 éleveurs, des souches *E. coli* du sérotype O26, toutefois différentes de celles retrouvées dans les fromages, ont été trouvées en grand nombre à la fois dans l'eau de boisson mais également dans l'ensilage et le foin donné aux bovins qui étaient par ailleurs porteurs sains de *E. coli* O26. Une enquête plus poussée a permis de montrer que des milliers d'étourneaux porteurs sains de *E. coli* O26, s'étaient introduits dans ces 4 exploitations. Il a donc été suggéré que l'origine de la contamination du lait était liée à l'arrivée massive de ces oiseaux, porteurs sains de ce pathogène, et, alors même que l'hygiène de la traite était bonne, la pression de contamination se trouvant plus forte, il y a eu présence du pathogène dans le lait produit à l'échelon de ces 4 exploitations (Espié *et al.*, 2006b).

L'implication des éléments acides dans les épidémies justifie pleinement que l'on s'interroge

sur les caractéristiques physiologiques des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines dans ces aliments en indiquant, quand ils seront connus, les principaux mécanismes mis en cause et les différentes études menées visant à déterminer la survie et la croissance de ces pathogènes dans certains aliments acides, qu'ils soient d'origine carnée ou végétale.

## **2 Résistance des STEC aux pH acides**

### **2.1 Survie des STEC à différents pH et en présence d'acides minéraux et d'acides organiques**

En milieu synthétique de laboratoire, on obtient en moyenne pour *E. coli* O157:H7, des valeurs de pH optimum d'approximativement 6,9 et de pH maximum de 9,4 (Nauta and Dufrenne, 1999) Les valeurs moyennes de pH minimum obtenues en milieu synthétique varient, en fonction de l'acide utilisé : elles sont de 4,2 pour l'acide chlorhydrique (McKellar and Knight, 1999), 4,3 pour l'acide citrique (Nauta and Dufrenne, 1999) et de 5,5 pour l'acide acétique (McKellar and Knight, 1999).

Ainsi, les plages de pH permettant la croissance de *E. coli* O 157:H7 sont tout à fait similaires à celles observées pour les autres *E. coli*. Les valeurs de pH minimum dépendent fortement de la nature de l'acide employé. Comme généralement observé, les acides organiques sont plus efficaces que les acides minéraux pour inhiber la croissance de *E. coli* O157:H7 (Buchanan and Edelson, 1999). D'une manière générale, les formes non dissociées des acides organiques peuvent pénétrer, par diffusion, dans la cellule puis se dissocier, abaissant ainsi le pH intracellulaire, ce qui a pour effet d'inhiber de nombreux mécanismes métaboliques. Les différents acides organiques ont des efficacités variables. Ainsi, l'acide lactique et l'acide acétique ont été décrits comme les molécules les plus efficaces pour inhiber la croissance des

*E. coli* O157:H7. En effet, à un pH identique la concentration de la forme non dissociée de ces acides est plus élevée que celles d'autres acides organiques, tels que l'acide malique ou l'acide citrique. Buchanan et Edelson (1999) ont montré que l'effet antimicrobien de l'acide lactique aux pH acides (3- 3,7) est plus fort que celui de l'acide acétique quelle que soit la phase de croissance (phase exponentielle ou stationnaire). Au contraire, (Deng *et al.*, 1999) ont montré une plus forte inhibition par l'acide acétique aux pH 4,7 à 6,0.

### **2.2 Mécanismes d'adaptation à l'acidité**

#### **2.2.1 Différentes terminologies de réponses au stress acide**

Au cours des 10 dernières années, l'existence de mécanismes d'induction à l'acidité pour étudier la survie des entérobactéries est devenue évidente. Les pathogènes le plus étudiés en terme de réponses au stress acide sont les salmonelles, *Shigella* et *E. coli*. Cependant, la comparaison des résultats entre les laboratoires est difficile à cause de conditions expérimentales différentes (milieu minimal versus milieu complexe, phase exponentielle versus phase stationnaire de croissance, conditions d'adaptation ou conditions de stress acides différents etc.). Différentes terminologies ont également été employées pour décrire les systèmes de réponse au stress acide. La résistance à l'acidité (AR) et la réponse à la tolérance acide (ATR) sont les termes employés pour décrire la survie

des bactéries en présence d'un stress engendré par un pH bas mais en conditions différentes. Par soucis de clarté il nous faut définir ces termes.

### **La tolérance à l'acidité (AT)**

Le processus pour lutter contre le stress acide mis en place par *E. coli* désigné sous les termes de tolérance à l'acidité (ATR), est déclenché en phase logarithmique de croissance. Les bactéries sont exposées à un milieu modérément acide compris entre 5 et 5,5. Cette phase correspond à une adaptation des bactéries à l'acidité, adaptation qui permet ensuite à *E. coli* de mieux survivre à un stress acide avec des pH de l'ordre de 2,5 (Foster, 1993; Foster and Hall, 1990).

### **Résistance à l'acide (AR)**

Contrairement à l'ATR, le processus de résistance à l'acidité (AR) déclenché par *E. coli* ne nécessite pas de phase d'adaptation des bactéries dans un milieu de pH modéré pour résister à un stress acide de l'ordre de 2 à 2,5. Cette AR est limitée à la phase stationnaire de croissance des bactéries

#### **2.2.2 Mécanismes décrits chez *E. coli* K12**

*E. coli* a développé des systèmes de protection pour faire face à ces changements de pH et notamment, des systèmes lui permettant de résister plusieurs heures à pH 1,5-2. Leur efficacité est augmentée si *E. coli* est précédemment cultivée à pH modérément acide (AH) (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Beutin *et al.*, 1997). Les mécanismes associés à cette résistance à l'acidité sont divers. D'une part, la modification de la composition en protéines de la membrane est supposée diminuer la perméabilité aux ions H<sup>+</sup> ce qui contribue à assurer une homéostasie vis-à-vis du pH (Iyer *et al.*, 2002; Booth, 1999; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Hersh *et al.*, 1996; Slonczewski and Foster, 1996). D'autre part, des systèmes plus spécifiques, neutralisent les protons entrant dans la cellule ce qui contribue à augmenter le pH intérieur (pHi). Quatre systèmes dits AR, « acid resistance », ont été identifiés. Le premier est capable de protéger la cellule en phase stationnaire, il est dépendant de RpoS, le facteur  $\sigma$  associé à cette phase, du complexe CRP-AMPc et il est inhibé en présence de glucose (Price *et al.*, 2004; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Beutin *et al.*, 1996). La présence de glucose dans le milieu permet de révéler trois autres systèmes, AR2, AR3 et AR4. Ces systèmes décarboxylent respectivement le glutamate, l'arginine et la lysine en  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA), agmatine et cadavérine, qui sont expulsés dans le milieu extérieur (Figure 9). Ces réactions consomment un H<sup>+</sup> et produisent du CO<sub>2</sub>. Lorsque le pH extérieur est de 2,5, ces décarboxylations permettent l'augmentation du pHi de 3,6 à 4,2-4,7, et l'inversion du potentiel membranaire, essentielle pour la survie d'*E. coli* (Richard and Foster, 2004).

Le système arginine décarboxylase se compose des gènes *adiA*, codant l'arginine décarboxylase et de *adiC*, codant l'antiport arginine/agmatine (Gong *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2003). Son fonctionnement requiert la présence d'arginine dans le milieu de culture. L'expression de ce système en phase stationnaire de croissance est dépendante de RpoS alors qu'en phase exponentielle, elle est dépendante du pH extérieur (pHo). H-NS, un régulateur négatif global, AdiY et CysB interviennent également dans la régulation de ce système (Beutin *et al.*, 1996; Stim-Herndon *et al.*,

1996; Chapman *et al.*, 1993) (Figure 9A).

Ce n'est que très récemment que la lysine décarboxylase est considérée comme conférant une résistance à l'acidité chez *E. coli* (Arthur *et al.*, 2004; Richard and Foster, 2004; Iyer *et al.*, 2003). Ce système requiert la présence de lysine dans le milieu de culture et se comprend la lysine décarboxylase, codée par le gène *cadA* et l'antiport cadavérine/lysine, codé par le gène *cadB*. Ces gènes forment un opéron, *cadBA* (Figure 9B) (Slonczewski and Foster, 1996). *CadC* est le régulateur positif (Dell *et al.*, 1994). Son activité dépend du pH et de la présence de lysine (Neely and Olson, 1996; Dell *et al.*, 1994; Meng and Bennett, 1992). Ce système est induit par la lysine, le pH acide, l'anaérobiose et réprimé par H-NS (Neely and Olson, 1996; Dell *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1993).

Enfin, le système de résistance via les glutamate décarboxylases est le plus performant de tous les systèmes connus chez *E. coli*. Ce système est induit en phase stationnaire de croissance lorsque les cellules sont cultivées en milieu minimum à pH acide. Son expression est alors indépendante du pH et du milieu de culture (Bhagwat, 2003; Castanie-Cornet and Foster, 2001; De Biase *et al.*, 1999). Pour fonctionner, ce système nécessite la présence de glutamate extracellulaire. Il se compose des gènes *gadA*, *gadB* et *gadC* (Figure 9C). Les gènes *gadA* et *gadB* codent deux isoformes, ne pouvant pas être biochimiquement différenciés, de l'acide glutamique, et le gène *gadC* code un antiport glutamate/GABA (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; De Biase *et al.*, 1999). Les gènes *gadW*, *X*, *E*, *ydeO* et *evgAS* codent des régulateurs de ce système (Arthur *et al.*, 2004; Hommais *et al.*, 2004; Barua *et al.*, 2002; Masuda and Church, 2002; Hancock *et al.*, 2001; Hommais *et al.*, 2001). La régulation est extrêmement complexe et sa hiérarchie n'est pas encore complètement comprise. En plus de ces gènes, interviennent des régulateurs globaux comme RpoS, HNS et CRP-AMPc ainsi qu'un ARN non-codant *gadY* (Giangrossi *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2004; Hommais *et al.*, 2004; Opdyke *et al.*, 2004; Bhagwat, 2003; Barua *et al.*, 2002; Masuda and Church, 2002; Castanie-Cornet and Foster, 2001; Hommais *et al.*, 2001; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; De Biase *et al.*, 1999) (Figure 9C).

Ces systèmes de décarboxylation largement conservés sont présents chez d'autres entérobactéries, comme *Shigella flexneri* et *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. Cependant, ces bactéries ne possèdent pas chacun des 3 systèmes de décarboxylation. Ainsi, *S. enterica* possède les systèmes arginine et lysine décarboxylases alors que *S. flexneri* possède les systèmes arginine et glutamate décarboxylases (Bearson *et al.*, 1997; Beutin *et al.*, 1997).

Ainsi, les réactions de décarboxylation des acides aminés consomment un proton intracellulaire ce qui permet de maintenir l'acidité du pH intracellulaire. Ces systèmes exigent également la participation de un voire de trois  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  anti-porteurs, bien que leur rôle reste à ce jour encore flou (Mates *et al.*, 2007).

Malgré des études assez importantes et pointues concernant la résistance à l'acidité de *E. coli*, il n'en reste pas moins vrai que de nombreuses zones de connaissance restent encore floues. Un cluster de 12 gènes localisés à 78,8 min (bp 3652313 à 36665210) sur le génome de *E. coli* K12 (Figure 10) a été dénommé îlot d'acidité. Ces gènes (*slpA* jusqu'à *gadA*) sont uniques à l'espèce *Escherichia coli* qui est très proche de *Shigella* qui, montre également un niveau important d'acido-résistance.

Des études, utilisant la technique des puces ADN, ont pu montrer que la majeure partie des gènes de cet îlot d'acidité sont induits par la croissance dans des conditions acides. Ainsi, des mutations de certains éléments de cet îlot ont été associées à l'incapacité de *E. coli* de survivre à des environnements avec des pH voisins de 2 (Hayes *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2006; Masuda and Church, 2003; Tucker *et al.*, 2002).

Les gènes les plus importants de cet îlot, sont très certainement le *gadA* codant une isozyme de la glutamate décarboxylase (Shul'ga *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1992) et le *gadE* un activateur essentiel du système d'acido-résistance dépendant du glutamate. Notons que 2 autres gènes dans cette région, le *gadX* et le *gadW* sont impliqués dans la modulation de l'expression de *gadE* ainsi que dans l'expression de *gadA* et de *gadBC* (Giangrossi *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003; Tramonti *et al.*, 2003; Tucker *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2002; Tramonti *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2001). Cependant, leur contribution dans l'interrelation entre gènes de cet îlot d'acidité reste à ce jour, inconnue.

### 2.2.3 Mécanismes décrits chez les STEC

En milieu riche glucose, une souche d'*E. coli* K-12 est 700 à 2400 fois plus sensible à un pH de 2 que des souches O157:H7 (Beutin *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996). *E. coli* O157:H7 possède comme *E. coli* K-12, les systèmes glutamate et arginine décarboxylase (Price *et al.*, 2004; Bhagwat, 2003; Beutin *et al.*, 1996). Bien que présent dans le génome, entièrement séquencé, de *E. coli* O157:H7, le système lysine décarboxylase n'a jamais été caractérisé chez les souches STEC. Comme pour *E. coli* K-12, RpoS semble également impliquée dans la résistance acide de O157:H7 (Price *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2000; De Biase *et al.*, 1999; Waterman and Small, 1996). En effet, l'inactivation du gène *rpoS* chez O157:H7 entraîne une diminution de la protection par les systèmes glutamate et arginine décarboxylases. La résistance résiduelle observée montre que d'autres régulateurs que RpoS contrôle l'induction de ces deux systèmes (Price *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2000; Beutin *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'inactivation génétique de ces systèmes de résistance à l'acidité montre que le système AR1 permet la survie dans le cidre, pH: 3,5 à 4, alors que le système AR2, glutamate décarboxylase, permet la résistance lors du passage dans le tractus intestinal bovin, pH: 2,0 à 2,5 (Price *et al.*, 2004).

Leyer *et al.*, (1995) ont montré que la survie de *E. coli* O157:H7 dans des environnements acides est liée à une résistance à l'acidité, dépendante du pH du milieu. Ainsi, l'adaptation des cellules de *E. coli* O157:H7 à des conditions acides (pH 5) favorise leur survie dans une solution d'acide lactique à pH 3,8 ainsi que dans des aliments à pH moyennement acide à acide (salami, pH :5 ; jus de pommes, pH: 3,4). Et les auteurs de mettre en relief l'importance de cette phase d'adaptation dans la réalisation de tests d'épreuve microbiologique (« challenge test »). Ainsi, de nombreux travaux sur *E. coli* O157:H7 ont montré qu'une croissance en milieu modérément acide (pH 5) induit une adaptation qui favorise la survie de la bactérie dans des milieux à très bas pH (Marques *et al.*, 2001; Buchanan and Edelson, 1999; Brudzinski and Harrison, 1998; Uljas and Ingham, 1998; Benjamin and Datta, 1995; Leyer *et al.*, 1995). Une fois induite, la résistance à l'acidité est stable pendant le stockage réfrigéré (Vernozy-Rozand and Montet, 2001). Par ailleurs, Cheville *et al.* (1996) ont montré que la résistance à l'acidité de *E. coli* O157:H7 est associée à l'action du gène régulateur



*rpoS*. En particulier, le gène *rpoS* code pour le facteur  $\alpha^{38}$  qui régule l'expression d'une trentaine de protéines synthétisées dans les cellules entrant en phase stationnaire de croissance, certaines d'entre elles conférant une résistance accrue non seulement à des stress acides, mais aussi osmotiques ou thermiques (Cheville *et al.*, 1996). Lin *et al.* (1996) ont montré qu'un ensemble de souches de *E. coli* O157:H7 possédait des décarboxylases dont la synthèse était induite par un choc acide, l'efficacité de ces systèmes étant variable en fonction des souches. Cette efficacité des systèmes varie avec le type d'acide utilisé. Par exemple, le premier système mis en place pour la survie à pH 4 en présence d'acide benzoïque est le système glutamate décarboxylase, alors qu'en présence d'un mélange d'acides gras destiné à simuler les conditions rencontrées dans l'intestin grêle, les deux systèmes, glutamate et arginine décarboxylases, se mettent en place. Certains auteurs ont également évoqué des propriétés liées à la membrane de *E. coli* et notamment la nécessité d'une expression complète du lipopolysaccharide O et de l'ECA (Enterobacterial Common Antigen) pour résister à l'acide acétique et autres acides gras à courte chaîne (Barua *et al.*, 2002).

Des études ont permis de montrer des variations inter-souches du sérotype O157:H7 dans les capacités à résister à l'acidité (acido-résistance). Il a été observé d'une manière générale, un continuum des capacités de survie permettant de classer les souches de fortement résistantes à sensibles. Par exemple, l'étude menée par Buchanan et Edenson (1999) a permis de montrer que cette capacité de survie dans des environnements acides variait de manière très significative selon les isolats du même sérotype O157:H7. D'autre part, ils ont montré que l'acido-résistance des souches EHEC présentes en phase stationnaire de croissance, était dépendante du type d'acide et dépendante également du système d'acido-résistance qui avait été induit (Buchanan et Edelson, 1999). Benjamin et Datta (1995) ont comparé la survie de 6 souches *E. coli* O157:H7 en bouillon LB et à pH: 2,5. Ils ont montré que 2 des 6 souches pouvaient être considérées comme particulièrement acido-résistantes alors que les 4 autres étaient acido-sensibles. Leyer *et al.*, (1995) ont mesuré la survie de 5 souches d'*E. coli* O157:H7 adaptées ou non adaptées à l'acidité. Bien que les cellules préalablement adaptées à l'acidité aient un meilleur taux de survie que celles qui n'étaient pas adaptées, il y a une réelle variabilité dans les taux de survie parmi les souches. Lin *et al.*, (1996), ont testé quant à eux, 11 souches d'*E. coli* O157:H7 pour évaluer leur capacité d'utiliser les 3 différents mécanismes d'acido-résistance (AR1, AR2 et AR3). Ils ont déterminé que toutes les souches d'*E. coli* O157:H7 n'ont pas la même capacité de survie dans des environnements à pH bas et n'utilisent pas le même mécanisme d'acido-résistance.

Plus récemment, Large *et al.*, (2005) ont quantifié les taux de survie d'*E. coli* entéro-hémorragique appartenant à différents sérotypes: O157:H7, mais aussi O26:H11, O111:H8 et O121:H19 ainsi que 6 souches commensales d'*E. coli*. Ils ont montré à cette occasion que les souches des EHEC n'étaient pas significativement plus acido-résistantes que les souches dites commensales en analysant chacun des mécanismes d'acido-résistances (AR1, AR2, AR3) pouvant être impliqués. Ils ont également montré que le système glutamate apportait le meilleur niveau de protection dans les environnements très acides pour chacun des groupes étudiés, avec 0,1 log<sub>10</sub> de réduction du nombre de UFC/ml par heure à pH: 2. Dans ces conditions extrêmes, il y avait toutefois des variations notables dans les taux de survie des 30 souches de *E. coli* O157:H7 qui semblaient

dépendre plus particulièrement de la concentration en ion  $Mg^{2+}$ . Ce qui était surprenant, c'est que le niveau moyen du taux de survie des souches O157:H7 n'était pas significativement supérieur aux taux de survie des autres sérotypes (EHEC); il était même significativement inférieur avec le système oxydatif, par rapport au sérotype O26:H11. Ainsi, ces travaux ont permis de montrer que le sérotype O157:H7 ne présentait pas une acido-résistance plus marquée que les autres sérotypes de EHEC étudiés dans cette étude pour les 3 mécanismes d'acido-résistance testés: arginine, glutamate et système oxydatif.

Certains chercheurs ont essayé, quant à eux, d'évaluer plus finement la nature des mécanismes d'acido-résistance mis en place et l'impact d'éventuelles mutations génétiques sur la disparition de l'acido-résistance des STEC (Bhagwat *et al.*, 2005 ; Walterman et Small, 1996). Walterman et Small (1996), ont montré que 13 des 58 souches STEC isolées d'origine variée, contenaient en fait des mutations au sein du gène *rpoS* et présentaient concomitamment une sensibilité exacerbée à l'acidité, prouvant par là-même, l'importance du système oxydatif (AR1) dans l'acido-résistance des souches.

L'induction de l'acido-résistance ou tolérance peut modifier la résistance à d'autres traitements assainissants tels que les traitements thermiques (Cheng *et al.*, 2002), l'irradiation ionisante ou non (Buchanan *et al.*, 1999), la présence d'agents anti-microbiens (Buchanan *et al.*, 1999). Ainsi, parmi 3 souches de *E. coli* O157 préalablement adaptées à un environnement acide (pH 5), deux d'entre elles (ATCC 43889 et ATCC 43895) montrent une thermorésistance accrue mais une résistance à l'éthanol moindre par rapport aux cellules des mêmes souches non adaptées (Cheng *et al.*, 2002).

### **3 Effet de la formulation de la matrice alimentaire et de ses conditions de conservation sur la résistance à l'acidité des STEC**

#### **3.1 Variabilité de sensibilité des souches aux pH acides**

L'acido-résistance varie considérablement en fonction des souches de STEC étudiées. Benjamin et Datta (1995) ont montré une grande variabilité de résistance aux acides parmi un ensemble de souches EHEC qui peuvent ainsi être classées en 3 catégories: fortement, moyennement et faiblement acido-résistantes, d'après leur survie observée, *in vitro*, à pH 2,5. Aucun lien direct n'a été observé entre l'acido-résistance et le sérotype, la présence d'une ou des deux Shiga-like toxines ou bien l'origine d'isolement des souches EHEC. En particulier, une souche EHEC de sérotype O157:H7 présentait une tolérance aux acides semblable à celle de *Shigella flexneri*, pouvant survivre *in vitro* au moins 5 heures à des pH de 3,0 et de 2,5. Buchanan et Edelson (1999) ont également mis en évidence une variabilité de sensibilité à l'exposition aux pH acides pour un ensemble de souches EHEC (7 souches de sérotype O157:H7, une O111:H-) et pour une souche de *E. coli* non EHEC (ATCC 25922). De même, Uyttendaele *et al.*, (2001b) ont identifié sur un ensemble de 14 souches de *E. coli* O157:H7 lors de travaux sur l'efficacité du traitement de décontamination de carcasses de boeuf avec des sprays d'acide lactique, des souches résistantes, des souches sensibles et des souches à résistance inductible, parmi 14 souches de *E. coli* O157:H7 étudiées. La survie de *E. coli* O157:H7 dans des matrices à pH acide est non seulement dépendante de la souche et du type d'acide imposant

le pH, mais est aussi fortement liée à la présence simultanée d'additifs dans la matrice ainsi qu'à la température de conservation des denrées.

### 3.2 Etudes en milieux synthétiques

En général, la survie de *E. coli* O157:H7 en milieu acide est d'autant plus importante que les chocs physiologiques subis par la bactérie ont été sévères et que les paramètres de croissance deviennent suboptimaux. L'adaptation en milieu acide et ses conséquences sur l'effet des chocs ultérieurs varient en fonction des souches étudiées et des types de chocs appliqués. Pour certaines souches, l'acidotolérance est d'autant plus grande que l'osmolarité du milieu est forte (Cheville *et al.*, 1996b). En particulier, Casey et Condon (2002) ont montré que la présence de 4 % de NaCl améliore considérablement la survie de cellules de *E. coli* O157:H45 en phase exponentielle de croissance placées dans un milieu à pH 4,2 imposé par l'acide lactique. Il y a 1000 fois plus de cellules survivantes en présence de 4 % de NaCl qu'en son absence. La mesure du pH intracellulaire dans les 2 cas (en présence d'acide lactique et en présence ou absence de sel) montre une différence de 0,56 unité pH : il apparaît que le sel permet aux cellules de *E. coli* de contrer l'effet d'abaissement du pH intracellulaire dû aux acides organiques et, ainsi, de mieux résister dans le milieu acidifié. Ceci montre que l'addition simultanée de deux agents potentiellement antimicrobiens ne produit pas toujours l'effet additif escompté.

Molina *et al.*, (2005) ont étudié l'effet de bouillons acides et de jus de fruit sur la croissance et la survie de souches STEC comprenant 5 souches de sérotypes O26:H11, O91:H21, O111:H, O145:H- et O174:H2, isolées de steaks hachés ou de fèces de bovins, une souche O157:H7 isolée de cas humain, et une souche O157:H7 isolée de bovin. Les auteurs ont évalué la capacité de ces souches à se développer dans des bouillons acides notamment le bouillon LB supplémenté avec de l'acide acétique ou citrique et ajusté à différentes valeurs de pH. Ces différents bouillons ont ensuite été inoculés avec des souches en phase stationnaire de culture de manière à déterminer le pH minimal de croissance. Ils ont montré à cette occasion que le paramètre dépendait de la souche bactérienne, du type et de la concentration de l'acide organique utilisé. Plus particulièrement, la souche *E. coli* O91:H21 se développait mieux dans un bouillon supplémenté avec 0,1 mol/l acide acétique pH 5,5, que les 2 souches *E. coli* O157:H7. L'acide acétique a exercé quant à lui un effet antibactérien beaucoup plus important que l'acide citrique à la même concentration et au même pH.

### 3.3 Etudes dans les aliments acides

#### 3.3.1 Aliments d'origine végétale

Le contexte d'épidémies lié au cidre et au jus de pomme a motivé de nombreux travaux concernant des matrices d'origine végétale.

Zhao *et al.*, (1993), ont étudié la survie et la croissance d'une souche *E. coli* O157:H7 dans du cidre de pomme. Les auteurs ont évalué l'efficacité de 2 conservateurs: 0,1% de benzoate de sodium et 0,1% de sorbate de potassium utilisés séparément ou en combinaison pour déterminer leur effet antimicrobien sur la bactérie. Les études ont été réalisées à 2 températures différentes, 8°C et 25°C, dans des cidres ayant des pH compris entre 3,6 et 4. Les résultats de l'étude ont révélé que les

populations d' *E. coli* O157:H7 augmentaient légèrement ( $1 \log_{10}/\text{ml}$ ), et restaient stables pendant en moyenne 12 jours à 8°C dans les lots inoculés avec une population initiale de  $10^5$  UFC/ml de *E. coli* O157:H7. Le pathogène pouvait survivre jusqu'à 31 jours à 8°C contre 3 jours à 25°C. Le sorbate de potassium a montré un effet bactéricide minime sur les populations d' *E. coli* O157:H7. Par contre, le taux de survie des souches de *E. coli* O157:H7 dans du cidre contenant le benzoate de sodium était beaucoup plus important (7 jours à 25°C). Les plus hauts taux d'inactivation ont été obtenus en combinant l'effet du benzoate de sodium et du sorbate de potassium. L'utilisation de 0,1% de benzoate de sodium, un conservateur accepté et utilisé par certains producteurs de jus de pommes aux Etats-Unis, serait de nature à augmenter de manière significative la sécurité du jus de pomme vis-à-vis du danger *E. coli* O157:H7.

De nombreuses méthodes sont utilisées aujourd'hui pour réduire le nombre de souches *E. coli* O157:H7 dans le jus de pomme ou le cidre. Ces méthodes incluent notamment l'utilisation de conservateurs (Reinders *et al.*, 2001): l'irradiation, le chauffage, la fermentation et l'utilisation de champ électrique pulsé. Récemment, Reinders *et al.*, (2001) ont démontré les effets inhibiteurs de la proline et de l'acide caféique sur une souche de *E. coli* O157:H7. L'acide caféique est l'acide phénolique le plus important présent dans les pommes, dont les effets antimicrobiens ont déjà été décrit (Parish, 1997; Tunçel and Nergiz, 1993). La concentration de l'acide caféique chute pendant la maturation des pommes de 1,3g/kg en juillet jusqu'à moins de 0,1g/kg en octobre quand le fruit est très mûr (Mosel and Herrmann, 1974). Durant le stockage au froid, la concentration de l'acide caféique chute encore plus radicalement (Mosel and Herrmann, 1974). Reinders *et al.*, (2001), ont montré que la survie de *E. coli* O157:H7 pouvait chuter de manière très importante dans les pommes et les produits à base de pomme quand la récolte a lieu entre juillet et septembre contrairement à des récoltes postérieures à octobre. Sur les bases de ces expérimentations, il peut être désormais fait l'hypothèse que l'acide et caféiques naturellement présents dans ces pommes récoltés durant les périodes dites favorables aient pu jouer un rôle naturellement protecteur.

De nombreux travaux s'accordent sur le fait que la survie de *E. coli* O157:H7 dans les aliments à pH acide, tels que des jus de fruits, des produits carnés fermentés ou des salades assaisonnées, est favorisée lorsque ceux-ci sont conservés à des températures de réfrigération (Uyttendaele *et al.*, 2001a; Skandamis and Nychas, 2000; Uljas and Ingham, 1998; Rocelle *et al.*, 1996; Conner and Kotrola, 1995; Zhao and Doyle, 1994). L'hypothèse émise concernant l'effet protecteur des basses températures sur la résistance aux pH acides est une altération des cinétiques de dénaturation protéique (Brown and Booth, 1991). Ainsi, Marques *et al.*, (2001) ont observé la survie de cellules de *E. coli* O157:H7 dans des pulpes de fruits à pH compris entre 2,5 et 3,3 et conservées 30 jours à 4°C. Par ailleurs, dans des salades de choux (coleslaw), à pH 4,3 ou 4,5, une population de *E. coli* O157:H7 ne montre que de faibles réductions au cours du stockage à 4, 11 ou 21°C (Wu *et al.*, 2002). La réduction la plus importante est toutefois observée lors d'une conservation des salades à 21°C. Inversement, à 7°C ou à -18°C, la survie de *E. coli* O157:H7 est d'autant plus importante que le pH est bas (Uyttendaele *et al.*, 2001a). Dans la pratique, le pilotage du pH des denrées alimentaires ne peut constituer le seul élément de maîtrise du danger STEC, et ceci est d'autant plus vrai que les denrées sont conservées à des températures de réfrigération.

### 3.3.2 Aliments d'origine animale

#### 3.3.2.1 Fromages

Dans la mesure où des fromages au lait cru ont été fabriqués pour déterminer la survie et la croissance des STEC, dans notre travail expérimental, il nous est apparu essentiel de donner des éléments généraux relatifs à la technologie fromagère.

##### 3.3.2.1.1 Données technologiques générales

###### a) **Définitions du fromage**

Le mot fromage vient du latin *formaticum* signifiant qu'il est fabriqué dans une forme appelée moule ou *forma*.

Sur le plan technologique, le fromage est principalement constitué de caséines, avec des matières grasses, des minéraux et de l'eau dans des proportions variant selon les types de fromages. La norme FAO/OMS n°A-6 (anonyme, 1978, modifiée en 1990) donne la définition suivante :

« Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu :

✓ par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaisons, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation,

✓ par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir du lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut. »

Selon cette même norme :

✓ Le fromage « frais ou non affiné » est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après la fabrication.

✓ Le fromage « affiné » est celui qui n'est pas prêt à la consommation immédiatement après la fabrication, qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.

✓ Le fromage « affiné aux moisissures » est celui dont l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques dans la masse et/ou la surface du fromage.

###### b) **Etapes de fabrication**

La fabrication des différents fromages détaillée ici est issue de l'ouvrage édité par la Food and agriculture Organisation (FAO) « Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine » (1995).

Après une éventuelle phase de préparation du lait, qui peut comprendre un traitement thermique, un ajustement des taux de matières grasses et azotées, le lait est tout d'abord coagulé. **La coagulation** correspond à la floculation des micelles de caséines, principales protéines du lait. Elle peut être réalisée par acidification lactique, sous l'action des bactéries lactiques, ou par action de la présure, avec diverses enzymes protéolytiques, ou par l'action simultanée de l'acidification et des enzymes. Trois grandes catégories de fromages résultent des 3 modes de coagulation : type « pâte fraîche » (par exemple, fromages blancs, petits suisses, cottage) pour une coagulation à caractère lactique, type « pâte pressée » (par exemple, gruyère, cantal, edam) pour une coagulation à caractère présure et type «pâte molle» (par exemple, camembert, munster, bleu) pour une coagulation mixte (Figure 11).

Vient ensuite **l'égouttage** qui est la séparation du caillé (phase solide) et du lactosérum (phase liquide composée d'eau, et des matières solubles telles que le lactose, les sels minéraux et les protéines solubles). Cette étape a pour objectif une diminution de la teneur en eau par synérèse, phénomène qui résulte de la contraction de la trame protéique du caillé et de l'évacuation du lactosérum. L'égouttage du caillé peut être amplifié par des opérations techniques comme le découpage, le brassage et la cuisson du mélange caillé-sérum, avant le moulage. Le pressage du caillé pour les fromages de type « pâte pressée » participe aussi l'égouttage pendant le moulage.

**Le salage** peut être réalisé dans la masse (salage des grains de caillé avant le moulage), en surface (salage à sec) ou dans un bain de saumure. Il a un triple rôle : (i) il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte ; (ii) il règle l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du fromage et par là favorise, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage ; (iii) il relève la saveur du fromage et masque ou exalte le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage.

Sauf dans le cas où le caillé est consommé à l'état frais, il subit ensuite **un affinage** qui correspond à l'ensemble des transformations des composés fermentaires (sucre, lactate, citrate), azotés (protéolyse) ou lipidiques (lipolyse) grâce aux activités microbiennes et enzymatiques. Cet affinage va modifier la composition, la valeur nutritive, la digestibilité et les caractères organoleptiques du caillé (aspect, consistance, saveur, odeur). Il constitue un processus très complexe en raison de la nature des substrats, de la diversité des agents responsables (microflore, enzymes), de la variété des transformations et du nombre de produits formés. Il est dominé par plusieurs phénomènes biochimiques dont les plus importants sont la fermentation des sucres résiduels (lactose et galactose) et des lactates (phénomène entamé dès la phase de salage), et le fractionnement des protéines et de la matière grasse.

Les protéines sont divisées en composés de taille de plus en plus réduite : polypeptides, peptides, acides aminés, ammoniac et composés aromatiques. Le fractionnement de la matière grasse est surtout notable dans le cas des pâtes persillées. Les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et glycérol, eux mêmes pouvant être transformés en résidus plus sapides et aromatiques (aldéhydes et cétones).

### **3.3.2.1.2 Etude de survie des STEC lors de fabrications fromagères**

Des travaux ont été réalisés pour étudier la survie de *E. coli* O157:H7 dans du Cheddar qui est un fromage au lait de vache, plus précisément une pâte pressée non cuite fabriqué entre autre au Royaume Uni. L'objectif de l'étude réalisée par Schlessler *et al.*, (2006) portait sur l'adéquation des 60 jours minimum de maturation requis pour ce fromage afin de réduire le nombre de *E. coli* O157:H7. Le fromage Cheddar a donc été réalisé avec du lait cru inoculé avec des inocula allant de  $10$  à  $10^5$  UFC/ml, d'un cocktail de 5 souches de *E. coli* O157:H7 acido-résistantes. Les échantillons ont été collectés à différentes étapes de la fabrication des fromages. Les auteurs ont rapportés des dénombrements de *E. coli* O157:H7 diminuant de  $1 \log_{10}$  dans le fromage âgé de 60 jours, de  $2 \log_{10}$  dans le fromage à 120 jours. Ces études ont confirmé des précédents rapports qui ont également indiqué que 60 jours d'affinage sont tout à fait insuffisants pour éliminer complètement *E. coli* O157:H7 de ce fromage (Reitsma and Henning, 1996; Frank *et al.*, 1977; Park *et al.*, 1973). Ainsi, un traitement de pasteurisation basse doit être conduit à  $64^\circ\text{C}$  pendant au moins 17,5 secondes sur le lait inoculé pour espérer une réduction de  $5 \log_{10}$  de *E. coli* O157:H7 (Reitsma and Henning, 1996).

Une étude réalisée au sein de l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, visait à déterminer la survie et croissance de *E. coli* O157:H7 dans des fromages lactiques au lait cru de chèvre (Vernozy-Rozand *et al.*, 2005b). Les valeurs de pH des fromages à 5 et 42 jours d'affinage augmentaient légèrement de 4,3 à 4,9 respectivement. Pour les 3 taux d'inoculation ( $10$ ,  $10^2$  et  $10^3$  ufc/ml de lait) le nombre de *E. coli* O157:H7 a diminué de moins de  $1 \log_{10}$  ufc/g après 20h (juste avant l'étape de moulage), et *E. coli* O157:H7 a pu être retrouvé même après 42 jours d'affinage.

Certaines technologies fromagères introduisent une phase de chauffage: c'est le cas notamment du fromage Italien Mozzarella. La Mozzarella est un fromage à pâte filée qui à l'origine est fabriqué à base de lait de bufflonne mais qui pour des raisons industrielles est également fabriqué à base de lait de vache. L'équipe de Spano *et al.*, (2003), a investigué la survie et la croissance de *E. coli* O157:H7 au cours de la fabrication de ce fromage Mozzarella fait à partir de lait pasteurisé et inoculé avec  $10^5$  ufc/ml de *E. coli* O157:H7. Deux températures de chauffage communément utilisées, c'est-à-dire  $70^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$  ont été utilisées sur du lait caillé et les effets sur la viabilité des *E. coli* O157:H7 inoculés ont été recherchés. D'une manière générale, le chauffage à  $80^\circ\text{C}$  pendant 5 min a résulté en une perte de viabilité d' *E. coli* O157:H7 alors que le chauffage à  $70^\circ\text{C}$  a simplement réduit le nombre de bactéries viables de  $1 \log_{10}$ . Il s'en est suivi des recommandations sur la fabrication de la Mozzarella qui doivent inclure des températures de chauffages au moins équivalentes à  $80^\circ\text{C}$  pendant 5 heures.

Reitsma et Henning, (1996), ont démontré que *E. coli* O157:H7 pouvait se développer très facilement pendant la production du Cheddar. Même avec un inoculum initial bas de 1 ufc/ml de lait, *E. coli* O157:H7 était détecté après 60 jours d'affinage. Avec un inoculum initial de  $10^3$  ufc/ml de lait la détection de *E. coli* O157:H7 était possible après 158 jours d'affinage. Ces résultats suggèrent la possibilité de développement de ce pathogène lors de contamination après l'étape de pasteurisation.

De même, une croissance importante du nombre de *E. coli* O157:H7 a été reportée pour la

fabrication du Camembert avec diminution faible du nombre initial de *E. coli* au bout de 10 à 20 jours d'affinage (Ramsaran *et al.*, 1998).

Même si la majeure partie des études ont été faite sur des fromages au lait cru, certaines d'entre elles ont été réalisées sur des laits fermentés, et notamment un travail récent publié en 2009 par l'équipe de Dlamini et Buys (2009). Cette étude a porté sur un lait de chèvre fermenté produit dans le sud de l'Afrique nommé « Amasi ». Le lait fermenté Amasi de fabrication commerciale a été comparé à une fabrication d'Amasi de type artisanal. Après 3 jours de stockage à 7°C, *E. coli* O157:H7 est présent dans l'Amasi de fabrication commerciale alors qu'il n'est pas possible de le détecter après 3 jours de stockage à température ambiante dans le fromage artisanal. Les auteurs mettent en avant plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce résultat. Le pH de l'Amasi traditionnel n'était pas très différent du pH de l'Amasi commercialisé respectivement pH: 4,0 et pH: 4,4. Par contre la microflore lactique connue pour produire entre autres des bactériocines était plus abondante dans l'Amasi traditionnel. La température de stockage, 7°C pour l'Amasi commercialisé contre un stockage à température ambiante pour l'Amasi commercialisé a également pu jouer un rôle déterminant dans la destruction des *E. coli* O157:H7 dans l'Amasi traditionnel.

### 3.3.2.2 Saucissons

Dans la mesure où des saucissons ont été fabriqués pour déterminer la survie et la croissance des STEC, dans notre travail expérimentale, il nous est apparu essentiel de donner des éléments généraux relatifs à la fabrication du saucisson.

#### 3.3.2.2.1 Données technologiques générales

En dépit des formules et techniques variées utilisées, la fabrication des saucissons repose sur un certains nombre de points-clés, qui eux restent immuables. Un saucisson est composé de viandes maigres et de gras, auxquels s'ajoutent un certain nombre d'ingrédients et d'additifs. Les viandes sont hachées et mélangées aux autres matières premières pour former la mûlée. Après embossage de la mûlée dans des boyaux, les saucissons sont étuvés puis séchés puis destinés à la consommation.

##### a) Les viandes

Un saucisson sec moyen est composé d'environ  $\frac{3}{4}$  de maigre pour  $\frac{1}{4}$  de gras (Les maigres correspondent aux muscles rouges striés rattachés aux os du squelette, alors que les gras correspondent aux tissus adipeux). Les fabrications s'orientent vers des produits pur porc néanmoins, le saucisson sec peut être fabriqué avec des maigres provenant de nombreuses espèces d'animaux de boucherie. La viande de coche (appellation professionnelle de la viande de truie) est la matière première de choix pour la fabrication du saucisson sec de par sa couleur plus intense que celle du porc, son potentiel gustatif et son pouvoir réducteur. Les viandes de bœuf, d'âne, de cheval et beaucoup plus rarement de mouton, de chèvre, de gibier à poil et de volailles peuvent être destinées à la fabrication de saucissons.

Le gras utilisé est exclusivement du gras de porc (ou de coche). Il provient essentiellement des gras externes, c'est-à-dire les gras de couverture de jambons, des épaules, des longes (bardière) etc. Il



est important de noter que les viandes maigres contiennent également des graisses.

### **b) Préparation de la mée**

Les opérations qui permettent la fabrication de la mée peuvent être diverses, mais ont toujours pour but le hachage des viandes et le mélange du maigre, du gras, des ingrédients (sel, nitrate, sucre), des épices et des ferments. Ces opérations peuvent être séparées ou simultanées selon le savoir faire du fabricant et le matériel dont il dispose.

Le hachage est un des points clés de la fabrication du saucisson sec. Il doit permettre d'une part d'obtenir une coupe franche des cellules musculaires afin de favoriser la pénétration du sel et la solubilisation des protéines de la viande et, d'autre part éviter l'écrasement du gras qui entraînerait inévitablement le farcissage de la pâte. Le hachage des viandes peut être effectué au cutter ou au hachoir ou par des méthodes mixtes.

### **c) L'embossage**

L'embossage ou le poussage, est l'opération qui consiste à pousser la pâte dans un boyau à l'aide de machines appelées pousseurs. Avec certains pousseurs, il est possible d'effectuer le vide dans la pâte au moment du poussage et de réaliser ainsi ce que l'on appelle le <sup>2</sup>poussage sous vide<sup>2</sup>. Celui-ci constitue un avantage indéniable pour la fabrication du saucisson sec, car en plus de l'amélioration de la présentation à la coupe (tranche compacte et sans trou d'air), il est un des éléments importants pour la stabilité de la couleur et le développement préférentiel des germes lactiques, plutôt anaérobies.

L'embossage est immédiatement suivi du ficelage ou du clippage qui assure la fermeture du boyau et peut être effectuée avec pause simultanée ou non d'un système permettant la suspension du saucisson.

### **d) Ensemencement de surface**

Immédiatement après embossage, on procède à l'ensemencement externe des saucissons qui consiste à répandre, sur toute la surface du saucisson, une solution riche en spores de moisissures sélectionnées. Il existe 3 méthodes d'ensemencement, par trempage, par aspersion et par pulvérisation. Lors du trempage, les saucissons sont trempés pendant quelques secondes, soit individuellement, soit groupés par bâtons complets, dans une solution contenant environ  $10^9$  spores par litre. L'inconvénient de cette pratique est que le milieu s'appauvrit progressivement et surtout qu'il se pollue au fur et à mesure du trempage des saucissons souillés par les manutentions et par leur contact avec des bâtons souvent en bois et rarement lavés. C'est la raison pour laquelle il faut veiller à renouveler les bains de trempage périodiquement et systématiquement. Lors de l'aspersion, les saucissons frais sont douchés avec une solution de même concentration en spores ( $10^9$  à  $5.10^9$  spores/litre), dont l'excédent est recueilli et recyclé. Elle se charge donc progressivement en pollution par les saucissons frais. Il faut donc la changer régulièrement et systématiquement. Lors de la pulvérisation, les saucissons disposés sur les cadres de séchage sont immergés dans un nuage de solution vierge pulvérisée, dont l'excédent n'est pas recyclé. Cette méthode est préférable aux deux autres, car l'ensemencement est toujours réalisé à partir d'une solution vierge, donc exempte de toute contamination.

Les saucissons sont ensuite égouttés afin d'éliminer l'eau d'aspersion des saucissons juste après ensemencement et à réduire l'humidité excessive des boyaux. L'égouttage s'effectue la plupart du temps en laissant les saucissons dans une enceinte non ventilée, à la température de 10 à 15°C, pendant 2 à 3 heures.

#### **e) Etuvage et maturation/dessiccation des saucissons**

Les saucissons frais, rangés sur des bâtons, qui sont eux-mêmes disposés sur des cadres ou des étendages, sont étuvés et séchés.

L'étuvage consiste à porter le saucisson à une température de 20 à 24°C dans des conditions d'hygrométrie variables et pendant un temps donné suivant la nature des saucissons. Il joue un double rôle : favoriser le développement de la flore interne responsable des fermentations nécessaires pour la bonne maturation des saucissons et assurer un début de dessiccation qui permet de réduire la durée de sèche et d'éviter un excès d'humidité à la surface des boyaux qui provoquerait un développement excessif de la fleur de surface (moisissures). Si l'étuvage n'est pas absolument indispensable, il assure cependant une sécurité et une régularité de la fabrication.

L'étuvage est suivi immédiatement d'une phase, appelée autrefois "premier régime" plus humide et à une température de 15/16°C. C'est à ce moment que la fleur extérieure apparaît et qu'elle se développe en formant un voile ou un duvet blanchâtre. Dans les installations modernes, ces deux phases se déroulent dans les mêmes enceintes, la température baissant progressivement vers 12/14°C.

C'est à cette température que les saucissons sont ensuite séchés dans des conditions d'hygrométrie et pendant des durées variables suivant les types de saucissons (le temps de sèche augmentant avec le diamètre du produit). Le séchage consiste donc à faire passer sur les saucissons un courant d'air sec qui, à leur contact se charge en vapeur d'eau, éliminant ainsi une partie de l'eau qu'ils contiennent. Le rôle de cette dernière phase est de poursuivre le séchage des saucissons jusqu'à ce qu'ils atteignent un taux de sèche permettant leur stabilisation et leur conservation sans l'aide du froid et que les processus de lipolyse et de protéolyse, responsables des arômes internes et externes aient eu le temps de se produire.

Il est important de souligner que les paramètres de l'étuvage et du séchage (températures, hygrométrie, temps) varient en fonction du produit fabriqué et du matériel utilisé, mais aussi des fabricants et des consommateurs.

#### **3.3.2.2 Etude de la survie des STEC lors de fabrications de saucissons**

Il est tout d'abord important de noter que les études publiées portant sur la survie des STEC dans des produits carnés fermentés ont été réalisées quasi exclusivement avec le seul sérotype O157:H7.

Les études de Glass *et al.*, (1992) et de Muthukumarasamy et Holley (2007) sur des saucisses sèches fermentées, de pH: 4,9 et  $a_w$ : 0,88 en fin de période de séchage ont pointé le fait que le nombre de *E. coli* O157 :H7 diminuait de 1,7 log<sub>10</sub> UFC/g après 27 jours de séchage. Ceci est d'ailleurs en total accord avec d'autres études qui ont aussi rapporté 1 à 2 log de réduction décimale de la population de *E. coli* O157 :H7 en fin de processus de fermentation (Tableau 9) (Muthukumarasamy and Holley, 2007; Naim *et al.*, 2003; Faith *et al.*, 1998; Riordan *et al.*, 1998;

Faith *et al.*, 1997; Hinkens *et al.*, 1996).

Plus récemment Hwang *et al.*, (2009) ont quantifié la survie de *E. coli* O157:H7 dans des saucisses sèches fermentés à base de viande de bœuf (20% gras) dénommées Soudjouk pendant les étapes de fermentation (24°C), de séchage (22°C) et de stockage. Le taux d'inoculation des saucisses étaient de 6,5 log<sub>10</sub> UFC/g. Des fabrications de saucisses à des pH de 5,2 ; pH: 4,9 et pH: 4,6 ayant des a<sub>w</sub> respectifs de 0,92 ; a<sub>w</sub> : 0,89 et a<sub>w</sub>:0,86 et stockées à 4, 21 et 30°C pendant plus de 60 jours ont été étudiées. Les auteurs ont pu obtenir une réduction de 5,0 log<sub>10</sub> UFC/g de *E. coli* O157 :H7 pour des fabrications de Soujouk en combinant un pH de 4,9 des saucisses pendant l'étape de fermentation (~ 0,4 log<sub>10</sub> UFC/g de réduction), une étape de séchage à un a<sub>w</sub> de 0,86 (~ 2,5 log<sub>10</sub> UFC/g de réduction) suivi d'une étape de stockage à 21°C pour ≥ 10 jours (~ 2,3 log<sub>10</sub> UFC/g de réduction).

Les principaux travaux sont résumés dans le tableau 9.

D'une manière générale, l'inactivation de *E. coli* O157:H7 augmente avec la diminution du pH et l'augmentation des taux de sel et de nitrite (Lindqvist and Lindblad, 2009; Casey and Condon, 2000; Riordan *et al.*, 1998). Par ailleurs, le stockage des saucisses fermentées à une température supérieure à 20°C a été démontré comme beaucoup plus efficace dans l'élimination de *E. coli* O157:H7 que le stockage à 4°C (Sharma *et al.*, 2004; Calicioglu *et al.*, 2001; Faith *et al.*, 1998; Faith *et al.*, 1997). Par exemple, Faith *et al.*, (1997) ont montré qu'un taux de réduction de 5 log<sub>10</sub>/g de *E. coli* O157:H7 est obtenu après le stockage sous air de tranches de pepperoni à 21°C pendant quatre semaines, tandis que seulement 2 log de réduction décimale sont obtenus après stockage à 4°C pendant trois mois. Cependant, il faut garder en mémoire que le stockage à des températures plus élevées, même si elles sont intéressantes en termes de réduction du pathogène, peuvent se traduire par une augmentation de la rancidité oxydative et peut également se traduire, *in fine*, par une réduction de la durée de commercialisation du produit.

Depuis la 1<sup>ère</sup> épidémie répertoriée mettant en cause du salami contaminée avec du *E. coli* O157:H7 (Tilden *et al.*, 1996), des expérimentations ont été réalisées afin d'étudier la survie de *E. coli* O157:H7 lors du procédé de fabrication des saucisses fermentées. Aux Etats-Unis l'agence de sécurité et d'inspection de la nourriture (USDA-FSIS) a recommandé que le processus de fabrication des saucisses devrait mener à une réduction de 5 log<sub>10</sub> unité de réduction de la population de *E. coli* O157:H7 (Reed, 1995). Dès lors de nombreux travaux ont portés sur le développement de différents traitements pour atteindre cet objectif.

Dans une étude Chacon *et al.*, (2006) ont étudié la survie de cocktail de souches *E. coli* O157:H7 dans des fabrications de saucisses sèches fermentées inoculées à un taux compris entre 6 et 7 log<sub>10</sub> UFC/g. Les auteurs ont plus particulièrement voulu étudier l'effet de 3 concentrations (500, 750, 1,000 ppm) de allyl isothiocyanate (AIT) qui est un composé naturel formé quand des glucosinolates présents dans les légumes crucifères sont hydrolysés par une enzyme appelé myrosinase (Clydesdale, 1999). AIT est un inhibiteur efficace de nombreux pathogènes (Delaquis and

Sholberg, 1997; Kanemaru and Miyamoto, 1990), et a été utilisé avec succès pour éliminer *E. coli* O157:H7 dans de la viande de bœuf hachée, dans du bœuf rôti et dans les hamburgers (Nadarajah *et al.*, 2005; Muthukumarasamy *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 1998). Les pHs des différentes fabrications de saucisses ont chutés de 5,57 à 4,89 en 48h de fermentation pour des températures variant de 26 à 24°C. Les valeurs de pH sont restées stables jusque dans les dernières phases de séchage à 16 jours, ou une légère augmentation du pH à été observée. Les valeurs d' $a_w$  ont chuté de 0,960 en début de fermentation à 0,885 correspondant à la fin des 28 jours de fabrication des saucisses. Dans les saucisses n'ayant pas subi de traitement à l'AIT, les souches de *E. coli* O157:H7 ont survécu 45 jours avec une réduction de 2,4  $\log_{10}$  CFU/g. A l'inverse, les auteurs ont observé une réduction importante du nombre de *E. coli* O157:H7 intervenant dans les 3 premiers jours de fermentation les saucisses traitées avec différentes concentrations en AIT (500, 750, 1,000 ppm). Les saucisses traitées avec 500 ppm de AIT ont permis une réduction de 4,75  $\log_{10}$  UFC/g après 28 jours de fabrication et ce traitement à également permis d'éliminer plus de 6  $\log_{10}$  UFC/g de *E. coli* O157:H7 après 40 jours. Il est également à noter que le traitement des saucisses avec 500 ppm d'AIT n'entraînait pas de changements sensoriel inacceptable pour le consommateur.

Erkkila *et al.*, (2000) ont quant à eux étudiés l'impact de probiotique pour réduire le nombre de *E. coli* O157:H7. Dans cette étude, 3 types de saucisses sèches fermentées, (correspondant à 3 fabrications de saucisses faites avec 3 souches de *Lactobacillus* différentes) ont été inoculées avec *E. coli* O157:H7. Pour chacune des fabrications de saucisse, les auteurs de cette étude n'ont obtenu que 3  $\log$  UFC/g de réduction décimale, réduction qui ne remplissait donc pas les recommandations de l'USDA-FSIS et qui ne répondait pas à la grande question : comment diminuer le risque de contamination par *E. coli* O157:H7 dans les saucisses sèches ?

Pour conclure ce 2<sup>ème</sup> chapitre on peut dire que la contamination des denrées alimentaires par les STEC est toujours plus importante que la contamination par le seul sérotype O157:H7 (dans les études réalisées, moins de 5 % des viandes hachées de boeuf sont contaminées par *E. coli* O157:H7 alors que jusqu'à 30 % des échantillons étudiés peuvent être positifs. À ce jour, les données concernant la physiologie des STEC concernent essentiellement le seul sérotype O157:H7. Pour les autres sérogroupes (O26, O103, O111, O145...), les données sont quasiment inexistantes. La principale différence entre *E. coli* O157:H7 et les autres *E. coli* est que certaines souches présentent une capacité de survie bien supérieure en conditions acides (produits carnés ou laitiers fermentés, jus de fruits, salades assaisonnées...). Cette survie en milieu acide est favorisée lorsque les aliments sont conservés à une température de réfrigération. Enfin l'induction de l'acido-résistance ou tolérance peut modifier la résistance à des traitements assainissants tels que les traitements thermiques, l'irradiation ionisante ou non, la présence d'agents anti-microbiens.

## BIBLIOGRAPHIE

Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. and Ammar, M.S. (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 2364-2368.

- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., *et al* (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis.* **177**: 1588-1593.
- Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T. and Birkhead, G. (1997) Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect.* **119**: 1-8.
- Acton, D.F. and Gregorich, L.J. (1995) The Health of our Soils: Toward sustainable agriculture in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada.*
- AFSSA (2003) Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
- Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A. and Cheasty, T. (1999) Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch Dis Child.* **81**: 60-63.
- Allaby, M.A. and Mayon-White, R. (1995) *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **5**: 4-6.
- Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P, *et al* (2001) *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill.* **6**: 147-151.
- Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. and Suassuna, I. (1989) An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* **28**: 49-57.
- Anon. (1999) Control of *Escherichia coli* O157:H7 in dry and semi-dry fermented sausages. . Nepean, Ontario, Canada. Government of Canada, Canadian Food Inspection Agency.
- Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H. and Bullerman, L. (1992) Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J. Food Prot.* **55**: 379-381.
- Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Nou, X., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Kent, M.P., *et al* (2004) *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J Food Prot.* **67**: 658-665.
- Artz, R.R., Townend, J., Brown, K., Towers, W. and Killham, K. (2005) Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol.* **7**: 241-248.
- Baker, D.R., Moxley, R.A., Steele, M.B., Lejeune, J.T., Christopher-Hennings, J., Chen, D.G., *et al* (2007) Differences in virulence among *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from humans during disease outbreaks and from healthy cattle. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 7338-7346.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol.* **26**: 199-218.
- Barua, S., Yamashino, T., Hasegawa, T., Yokoyama, K., Torii, K. and Ohta, M. (2002) Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* **43**: 629-640.

- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L. (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ.* **49**: 1-21.
- Bearson, S., Bearson, B. and Foster, J.W. (1997) Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **147**: 173-180.
- Belongia, E.A., Osterholm, M.T., Soler, J.T., Ammend, D.A., Braun, J.E. and MacDonald, K.L. (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *Jama.* **269**: 883-888.
- Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., *et al* (1991) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J Infect Dis.* **164**: 338-343.
- Beltrametti, F., Kresse, A.U. and Guzman, C.A. (1999) Transcriptional regulation of the esp genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**: 3409-3418.
- Benjamin, M.M. and Datta, A.R. (1995) Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1669-1672.
- Benz, I. and Schmidt, M.A. (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol.* **6**: 1539-1546.
- Berry, E.D. and Cutter, C.N. (2000) Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1493-1498.
- Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. and Martin, C. (2001) Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol.* **39**: 3060-3065.
- Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G. and Griffin, P.M. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Jama.* **269** 2217-2220.
- Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K. (1996) Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J Clin Microbiol.* **34**: 2812-2814.
- Beutin, L., Gleier, K., Kontny, I., Echeverria, P. and Scheutz, F. (1997) Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. *Epidemiol Infect.* **118**: 199-205.
- Beutin, L., Bulte, M., Weber, A., Zimmermann, S. and Gleier, K. (2000) Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect.* **125**: 47-54.
- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I. and Orskov, F. (1988) Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. **267**: 576-588.
- Beutin, L., Steinruck, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G. and Appel, B. (2007)

Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol.* **102**: 630-639.

Bhagwat, A.A. (2003) Regulation of the glutamate-dependent acid-resistance system of diarrheagenic *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett.* **227**: 39-45.

Bhagwat, A.A., Chan, L., Han, R., Tan, J., Kothary, M., Jean-Gilles, J. and Tall, B.D. (2005) Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infect Immun.* **73**: 4993-5003.

Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M.A, *et al* (1997) Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect.* **119**: 299-305.

Bitzan, M., Ludwig, K., Klemm, M., König, H., Buren, J. and Müller-Wiefel, D.E. (1993) The role of *Escherichia coli* O157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicentre study. *Epidemiol Infect.* **110**: 183-196.

Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., *et al* (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ.* **53**: 23-45.

Boerlin, P. (1999) Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci.* **56**: 735-741.

Bolduc, D., Srour, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S. and Lim, G. (2004) Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Can Commun Dis Rep.* **30**: 81-88.

Bonardi, S., Maggi, E., Pizzin, G., Morabito, S. and Caprioli, A. (2001) Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol.* **66**: 47-53.

Booth, I.R. (1999) The regulation of intracellular pH in bacteria. *Novartis Found Symp.* **221**: 19-28; discussions 28-37.

Bopp, D.J., Sauders, B.D., Waring, A.L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., *et al* (2003) Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J Clin Microbiol.* **41**: 174-180.

Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Ilef, D., Cuvelier, B., Capek, I., *et al* (1997) Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* **11**: 36-39.

Bouvet, J., Bavai, C., Rossel, R., Le Roux, A., Montet, M.P., Ray-Gueniot, S., *et al* (2002a) Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* **77**: 91-97.

Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., *et al* (2002b) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in French pork. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 7-14.

- Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., *et al* (2002c) Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* **77**: 99-108.
- Brenner, D., Fanning, G., Miklos, G. and Steigerwalt, A. (1973) Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol.* **23**: 1-7.
- Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P. (2003) Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. *J Clin Microbiol.* **41**: 2716-2722.
- Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., *et al* (2001) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis.* **7**: 977-982.
- Brewster, D.H., Brown, M.I., Robertson, D., Houghton, G.L., Bimson, J. and Sharp, J.C. (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect.* **112**: 441-447.
- Brown, M.H. and Booth, I.R. (1991) Acidulants and low pH. In *Food preservatives Russell, N.J. and Gould, G.W. (eds). London, United Kingdom: Blackie Academic & Professional: 22-43.*
- Brudzinski, L. and Harrison, M.A. (1998) Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid. *J Food Prot.* **61**: 542-546.
- Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H. (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology.* **142 (Pt 11)**: 3305-3315.
- Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol.* **24**: 767-778.
- Buchanan, R.L. and Edelson, S.G. (1999) pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot.* **62**: 211-218.
- Buchanan, R.L., Edelson, S.G. and Boyd, G. (1999) Effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Food Prot* **62**: 219-228.
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. and Blattner, F.R. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4196-4204.
- Calderon, O. (2007) Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations *Arch Latinoam Nutr.* **57** 51-55.
- Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. and Griffin, P.M. (1996) Proposed New nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* **62**: 118-119.
- Calicioglu, M., Faith, N.G., Buege, D.R. and Luchansky, J.B. (2001) Validation of a manufacturing process for fermented, semidry Turkish soudjouk to control *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* **64**: 1156-1161.



- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., *et al* (1994) Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* **169**: 208-211.
- Carney, E., O'Brien, S.B., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S. and Duffy, G. (2006) Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol.* **23**: 52-59.
- Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoit, S., Deschenes, G., Nivet, H., *et al* (1993) Ecllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bull Epidemiol Hebdomadaire.* **1993**: 222-224.
- Casey, P. and Condon, S. (2000) Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of *Escherichia coli* O157. *International Journal of Food Microbiology.* **55**: 255-258.
- Casey, P.G. and Condon, S. (2002) Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *Int J Food Microbiol* **76**: 199-206.
- Cassels, F.J. and Wolf, M.K. (1995) Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *Journal of Indian Microbiology.* **15**: 214-226.
- Castanie-Cornet, M.P. and Foster, J.W. (2001) *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology.* **147**: 709-715.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. and Foster, J.W. (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**: 3525-3535.
- Castanie-Cornet, M.P., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C. and Cam, K. (2007) The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology.* **153**: 238-246.
- CDC (1996) Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7--Illinois, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **45**: 437-439.
- CDC (1997) *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers--Colorado *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **46**: 777-778.
- CDC (1999) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair--New York. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **36**: 803-805.
- CDC (2000) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **49**: 911-913.
- CDC (2002) Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Eating Ground Beef --- United States, June--July 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **51**: 637-639.
- CDC (2007) *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk--Washington and Oregon, November-December. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **56**: 165-167.
- CDSC (1999) *Escherichia coli* O157:H7 associated with eating unpasteurised cheese--update. *Commun Dis Rep CDR Wkly.* **15**: 131-134.

- CDSC (2000) Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurized milk. *Commun Dis Rep CDR Wkly.* **10**: 203, 206.
- Cebula, T.A., Payne, W.L. and 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. *J Clin Microbiol.* **33**: 248-250.
- Cerqueira, A.M., Guth, B.E., Joaquim, R.M. and Andrade, J.R. (1999) High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol.* **70**: 111-121.
- Chacon, P.A., Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. (2006) Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from fermented dry sausages at an organoleptically acceptable level of microencapsulated allyl isothiocyanate. *Applied and Environmental Microbiology.* **72**: 3096-3102.
- Chalmers, R.M., Aird, H. and Bolton, F.J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 124S-132S.
- Chalmers, R.M., Salmon, R.L., Evans, J., Chart, H., Kench, S.M., Coleman, T.J., *et al* (1999) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) risk factors in the farming environment. Abstracts of the second international symposium of the European study group on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Acta Clin. Belg.,.* **54-1**: 37.
- Chapman, P.A., Wright, D.J. and Higgins, R. (1993) Untreated milk as a source of verotoxigenic *E coli* O157. *Vet Rec.* **133**: 171-172.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, D.J., Norman, P., Fox, J. and Crick, E. (1992) Cattle as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Rec.* **131**: 323-324.
- Cheng, H.Y., Yang, H.Y. and Chou, C.C. (2002) Influence of acid adaptation on the tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 to some subsequent stresses. *J Food Prot* **65**: 260-265.
- Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Cheng, C.M. and Kaspar, C.W. (1996a) rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 1822-1824.
- Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Cheng, C.M. and Kaspar, C.W. (1996b) rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 1822-1824.
- China, B., Pirson, V. and Mainil, J. (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 3462-3465.
- Cieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J. and Smith, M.G. (1993) *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet.* **342**: 367.
- Clydesdale, F. (1999) Isothiocyanates. . *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**: 245-257.
- Cobbold, R. and Desmarchelier, P. (2001) Characterisation and clonal relationships of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Vet Microbiol.* **79**: 323-335.

- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., *et al* (1999) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med.* **130**: 202-209.
- Coia, J.E. (1998) Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **20**: 1-9.
- Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J. and Hanson, M.F. (2001) A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int J Food Microbiol* **66**: 63-69.
- Conedera, G., Mattiazzi, E., Russo, F., Chiesa, E., Scorzato, I., Grandesso, S., *et al* (2007) A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. *Epidemiol Infect.* **135**: 311-314.
- Conner, D.E. and Kotrola, J.S. (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**: 382-385.
- Cookson, A.L., Cooley, W.A. and Woodward, M.J. (2002) The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol.* **292**: 195-205.
- Cookson, S.T. and Nataro, J.P. (1996) Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol.* **21**: 421-434.
- Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M. and Riley, A. (2001) Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect.* **126**: 335-341.
- Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., *et al* (1999) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **18**: 286-288.
- Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., *et al* (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water? *Clin Nephrol.* **46**: 45-49.
- Craun, G.F., Calderon, R.L. and Craun, M.F. (2005) Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res.* **15**: 243-262.
- Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., *et al* (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med.* **347**: 555-560.
- Currie, A., MacDonald, J., Ellis, A., Siushansian, J., Chui, L., Charlebois, M., *et al* (2007) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of beef donair. *J Food Prot.* **70**: 1483-1488.
- Davey, K.R. and Smith, M.G. (1989) A laboratory evaluation of a novel hot water cabinet for the decontamination of beef sides. *Int. J. Food Sci. Technol.* **24**: 305-316.
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. and Visca, P. (1999) The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol.* **32**: 1198-1211.

De Schrijver, K., Buvens, G., Posse, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, O., De Zutter, L., *et al* (2008) Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Euro Surveill.* **13**.

Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B., *et al* (2000) Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect.* **124**: 215-220.

Delaquis, P. and Sholberg, P. (1997) Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. *J. Food Prot.* **60**: 943-947.

Dell, C.L., Neely, M.N. and Olson, E.R. (1994) Altered pH and lysine signalling mutants of cadC, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli* cadBA operon. *Mol Microbiol.* **14**: 7-16.

Deng, Y., Ryu, J.H., Beuchat, L.R. and . (1999) Tolerance of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J Appl Microbiol.* **86**: 203-210.

DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci.* **55**: 961-976.

Diez-Gonzalez, F. and Karaibrahimoglu, Y. (2004) Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* **96**: 1237-1244.

Dineen, S.S., Takeuchi, K., Soudah, J.E. and Boor, K.J. (1998) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J Food Prot.* **61**: 1602-1608.

Dlamini, B.C. and Buys, E.M. (2009) Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiol.* **26**: 58-64.

Doorduyn, Y., de Jager, C.M., van der Zwaluw, W.K., Friesema, I.H., Heuvelink, A.E., de Boer, E., *et al* (2006) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro Surveill.* **11**: 182-185.

Dorsa, W.J. (1997) New and established carcass decontamination procedures commonly used in the beef-processing industry. *J. Food Prot.* **60**: 1146-1151.

Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2002) Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **70**: 6761-6769.

Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol.* **12**: 289-301.

Doyle, M.P. and Schoeni, J.L. (1987) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol.* **53**: 2394-2396.

Duffell, E., Espie, E., Nichols, T., Adak, G.K., De Valk, H., Anderson, K. and Stuart, J.M. (2003) Investigation of an outbreak of *E. coli* O157 infections associated with a trip to France of schoolchildren from Somerset, England. *Euro Surveill.* **8**: 81-86.

Dziuban, E.J., Liang, J.L., Craun, G.F., Hill, V., Yu, P.A., Painter, J., *et al* (2006) Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ.* **55**: 1-30.

Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., *et al* (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **68**: 6115-6126.

Erkkila, S., Venalainen, M., Hielm, S., Petaja, E., Puolanne, E. and Mattila-Sandholm, T. (2000) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry sausage fermented by probiotic lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **80**: 2101-2104.

Erwert, R.D., Eiting, K.T., Tupper, J.C., Winn, R.K., Harlan, J.M. and Bannerman, D.D. (2003) Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog.* **35**: 87-93.

Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguenec, C. and Denamur, E. (2004) A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* **21**: 1085-1094.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. and Vernozy-Rozand, C. (2006a) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect.* **134**: 143-146.

Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., *et al* (2006b) Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows' cheese, France, 2005. *6th International Symposium on Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections. Melbourne Australia, 2006. Oct 30-Nov 1.*

Espié, E., Grimont, F., Mariani-Kurkdjian, P., Bouvet, P., Haeghebaert, S., Filliol, I., *et al* (2008) Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. *Pediatr Infect Dis J.* **27**: 595-601.

Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T. and Molbak, K. (2007) An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Euro Surveill.* **12**: E070531 070534.

Evans, J., Chalmers, R.M., Chart, H., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., *et al* (2000) Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Eur J Epidemiol.* **16**: 885-889.

Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F. and Grout, J. (2001) Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J Appl Microbiol.* **90**: 809-818.

Faith, N.G., Parniere, N., Larson, T., Lorang, T.D. and Luchansky, J.B. (1997) Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and -20 degrees C under air, vacuum and CO<sub>2</sub>. *International Journal of Food Microbiology.* **37**: 47-54.

Faith, N.G., Wierzba, R.K., Ihnot, A.M., Roering, A.M., Lorang, T.D., Kaspar, C.W. and Luchansky, J.B. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in full- and reduced-fat pepperoni after manufacture of sticks, storage of slices at 4 degrees C or 21 degrees C under air and vacuum, and baking of slices on frozen pizza at 135, 191 and 246 degrees C. *J Food Prot.* **61**: 383-389.

Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H. and Whittam, T.S. (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis.* **177**: 1750-1753.

Ferguson, D.D., Scheftel, J., Cronquist, A., Smith, K., Woo-Ming, A., Anderson, E, *et al* (2005) Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source--Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect.* **133**: 439-447.

Fernandez, G.C., Lopez, M.F., Gomez, S.A., Ramos, M.V., Bentancor, L.V., Fernandez-Brando, R.J., *et al* (2006) Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol.* **146**: 76-84.

Fiorito, P., Burgos, J.M., Miyakawa, M.F., Rivas, M., Chillemi, G., Berkowski, D., *et al* (2000) Effect of Shiga toxin 2 on water and ion transport in human colon in vitro. *Dig Dis Sci.* **45**: 480-486.

Food Safety Network (2006) Outbreaks of foodborne illness linked to fresh lettuce and spinach since 1993--Update Dec 13. *Food Safety Network 2007*.

Foster, G.H., Armstrong, C.S., Sakiri, R. and Tesh, V.L. (2000) Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocyte protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect Immun.* **68**: 5183-5189.

Foster, J.W. (1993) The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 1981-1987.

Foster, J.W. (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.* **2**: 898-907.

Foster, J.W. and Hall, H.K. (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**: 771-778.

Frank, J.F., Marth, E.H. and Olson, N.F. (1977) Survival of enteropathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Camembert cheese. *J. Food Prot.* **40**: 835-842.

Friedman, M.S., Roels, T., Koehler, J.E., Feldman, L., Bibb, W.F. and Blake, P. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin Infect Dis.* **29**: 298-303.

Gannon, V.P., Teerling, C., Masri, S.A. and Gyles, C.L. (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol.* **136**: 1125-1135.

Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M. and Zimmerhackl, L.B. (2002) Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis.* **186**: 493-500.

Ghebru, H. (1988) Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. *Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie, Nantes*.

Giangrossi, M., Zattoni, S., Tramonti, A., De Biase, D. and Falconi, M. (2005) Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*.

Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. and Doyle, M.P. (1992) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol*. **58**: 2513-2516.

Gong, S., Richard, H. and Foster, J.W. (2003) YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **185**: 4402-4409.

Gough, J.M., Conlan, L.L., Denman, S.E., Krause, D.O., Smith, W.J., Williamson, M.A. and McSweeney, C.S. (2006) Screening of bacteria from the cattle gastrointestinal tract for inhibitory activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, O111:H-, and O26:H11. *J Food Prot*. **69**: 2843-2850.

Gourmelon, M., Montet, M.P., Lozach, S., Le Mennec, C., Pommepuy, M., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. Appl. Microbiol*. **100**: 85-97.

Greatorex, J.S. and Thorne, G.M. (1994) Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**: 1172-1178.

Griffin, P., Mead, P., Van Gilder, T., Hunter, S., Strockbine, N. and Tauxe, R. (2000) Shiga Toxin-producing *E.coli* infections in the United States : current status and challenges. In *4th International Symposium and Workshop on "Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections (october 29-November 2, 2000)* Kyoto, Japan.

Griffin, P.M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infectious of the Gastrointestinal Tract*/Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Radvin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, : 739-758.

Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*. **13**: 60-98.

Griffin, P.M., Olmstead, L.C. and Petras, R.E. (1990) *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology*. **99**: 142-149.

Grimont, P. (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect (Numéro spécial)*: 6-10.

Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., Grimont, F. and Réseau des néphrologues pédiatres (2003) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*: soumis pour publication.

Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M. and Rice, D. (2001) The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol*. **66**: 71-78.

Harrison, S. and Kinra, S. (2004) Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a busy bathing beach. *Commun Dis Public Health*. **7**: 47-50.

- Hathcox, A.K., Beuchat, L.R. and Doyle, M.P. (1995) Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 4172-4177.
- Hayes, E.T., Wilks, J.C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D.P., Jones, B.D., *et al* (2006) Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multi-drug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* **6**: 89.
- Hersh, B.M., Farooq, F.T., Barstad, D.N., Blankenhorn, D.L. and Slonczewski, J.L. (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**: 3978-3981.
- Heuvelink, A.E., Zwartkuis-Nahuis, J.T., Beumer, R.R. and de Boer, E. (1999) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot.* **62**: 1115-1122.
- Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L., Zwartkuis-Nahuis, J., Herbes, R.G., Huyben, R., Nagelkerke, N., *et al* (1998) Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol.* **36**: 3480-3487.
- Hilborn, E.D., Mshar, P.A., Fiorentino, T.R., Dembek, Z.F., Barrett, T.J., Howard, R.T. and Cartter, M.L. (2000) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect.* **124**: 31-36.
- Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., *et al* (1999) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med.* **159**: 1758-1764.
- Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E. and Kangesu, E. (1996) An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **6**: R33-36.
- Hinkens, J.C., Faith, N.G., Lorang, T.D., Bailey, P., Buege, D., Kaspar, C.W. and Luchansky, J.B. (1996) Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection.* **59**: 1260-1266.
- Hofmann, S.L. (1993) Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci.* **306**: 398-406.
- Holme, R. (2003) Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol.* **47**: 1-6.
- Hommais, F., Krin, E., Coppee, J.Y., Lacroix, C., Yeramian, E., Danchin, A. and Bertin, P. (2004) GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **150**: 61-72.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., *et al* (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol.* **40**: 20-36.
- Honish, L., Zazulak, I., Mahabeer, R., Krywiak, K., Leyland, R., Hislop, N. and Chui, L. (2007) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis associated with consumption of beef donairs, Edmonton, Alberta, May-June 2006. *Can Commun Dis Rep.* **33**: 14-19.
- Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W. and Hrudey, E.J. (2003) A fatal waterborne



- disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci Technol.* **47**: 7-14.
- Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. and Acheson, D.W. (1999) Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* **67**: 6670-6677.
- Hwang, C.A., Porto-Fett, A.C., Juneja, V.K., Ingham, S.C., Ingham, B.H. and Luchansky, J.B. (2009) Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium during fermentation, drying, and storage of soudjouk-style fermented sausage. *Int J Food Microbiol.* **129**: 244-252.
- Ihekweazu, C., Barlow, M., Roberts, S., Christensen, H., Guttridge, B., Lewis, D. and Paynter, S. (2006) Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro Surveill.* **11**: 128-130.
- Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T. and Sherman, P.M. (1995) Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **63**: 3316-3326.
- Iyer, R., Williams, C. and Miller, C. (2003) Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **185**: 6556-6561.
- Iyer, R., Iverson, T.M., Accardi, A. and Miller, C. (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature.* **419**: 715-718.
- Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Ueno, N., Nagata, K., *et al* (2000) Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiol Lett.* **191**: 7-10.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., *et al* (1998) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect.* **120**: 17-20.
- Jarvis, K.G. and Kaper, J.B. (1996) Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun.* **64**: 4826-4829.
- Jay, M.T., Garrett, V., Mohle-Boetani, J.C., Barros, M., Farrar, J.A., Rios, R., *et al* (2004) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of beef tacos at a fast-food restaurant chain. *Clin Infect Dis.* **39**: 1-7.
- Jay, M.T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G.W., Sweitzer, R.A., Crawford-Miksza, L., *et al* (2007) *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis.* **13**: 1908-1911.
- Jenkins, C., Perry, N.T., Cheasty, T., Shaw, D.J., Frankel, G., Dougan, G., *et al* (2003) Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol.* **41**: 1775-1778.
- Jensen, C., Ethelberg, S., Gervelmeyer, A., Nielsen, E.M., Olsen, K.E. and Molbak, K. (2006) First general outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Euro Surveill.* **11**: 55-58.
- Jerse, A.E., Gicquelais, K.G. and Kaper, J.B. (1991) Plasmid and chromosomal elements involved in

the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **59**: 3869-3875.

Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 7839-7843.

Jeter, C. and Matthyse, A.G. (2005) Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**: 1235-1242.

Jung, I.L. and Kim, I.G. (2003) Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **278**: 22846-22852.

Kaddu-Mulindw, D.H., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. and Beutin, L. (2001) Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int J Food Microbiol.* **66**: 95-101.

Kanemaru, K. and Miyamoto, T. (1990) Inhibitory effects on the growth of several bacteria by brown mustard and allyl isothiocyanate. . *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **37**: 823-829.

Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology.* **2**: 123-140.

Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. and Heesemann, J. (1995) Longterm shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol.* **33**: 1602-1605.

Karmali, M.A. (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **2**: 15-38.

Karmali, M.A., Petric, M. and Bielaszewska, M. (1999) Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **37**: 396-399.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* **1**: 619-620.

Kassenborgh, H., Hedberg, C., Evans, M., Chin, G., Fiorentino, T.R., Vugia, D., *et al* (1998) Case-control study of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections in 5 Foodnet Sites. In *1st International Conference on Emerging Infectious Diseases* March 1998 Atlanta, Georgia-USA.

Kauffmann, F. (1947) The serology of the *E. coli* group. *J of Immun.* **57**: 71-100.

Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., *et al* (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Jama.* **277**: 1229-1231.

Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G.L., *et al* (1994) A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med.* **331**: 579-584.

Keene, W.E., (Oregon Department of Human Resources). (1993) *Personal communication*.

Kennedy, M.H., Rabatsky-Ehr, T., Thomas, S.M., Lance-Parker, S., Molhe-Boetani, J., Smith, K., *et al* (2002) Risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infections in the United States: a case

control study in Foodnet Sites 1999-2000. In *International Conference of Emerging Infectious Diseases* 24-27 march 2002 Atlanta, Georgia - USA.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. **91**: 511-520.

Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourt, J. and Richarme, G. (2006) *Escherichia coli* HdeB is an acid-stress chaperone. *J. Bacteriol.* **189**: 603-610.

King, L.A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Grimont, F., *et al* (2008) Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol Infect*: 1-8.

Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.W. and Steinrueck, H. (1997) Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **110**: 337-341.

Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. and Yamamoto, K. (2001) Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 484-489.

Kondro, W. (2000) *E. coli* outbreak deaths spark judicial inquiry in Canada. *Lancet.* **355**: 2058.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **18**: 775-779.

Kovacs, M.J., Roddy, J., Gregoire, S., Cameron, W., Eidus, L. and Drouin, J. (1990) Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med.* **88**: 177-179.

Laaberki, M.H., Janabi, N., Oswald, E. and Repoila, F. (2006) Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol.* **296**: 197-210.

Large, T.M., Walk, S.T. and Whittam, T.S. (2005) Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**: 2493-2500.

Le Minor, L., Popoff, M.Y. and Bockemuhl, J. (1990) Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology.* **141**: 1173-1177.

Lea, N., Lord, J.M. and Roberts, L.M. (1999) Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology.* **145** ( Pt 5): 999-1004.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L. (2002) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ.* **51**: 1-47.

Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J.L. and Tourneur, C. (1985) La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur.* **12**: 23-49.

Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A. and Yam, W.C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 7549-7553.

- Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* **155**: 377-389.
- Levine, M.M. and Edelman, R. (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews.* **6**: 31-51.
- Leyer, G.J., Wang, L.L. and Johnson, E.A. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 3752-3755.
- Licence, K., Oates, K.R., Syngé, B.A. and Reid, T.M. (2001) An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect.* **126**: 135-138.
- Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N. and Foster, J.W. (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 3094-3100.
- Lin, J., I. S. , Lee, J., Frey, J.L., Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **177**: 4097-4104.
- Lindgren, S.W., Melton, A.R. and O'Brien, A.D. (1993) Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun.* **61**: 3832-3842.
- Lindqvist, R. and Lindblad, M. (2009) Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *Int J Food Microbiol.* **129**: 59-67.
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. and Karmali, M. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem.* **262**: 8834-8839.
- Lio, J.C. and Syu, W.J. (2004) Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biomed Sci.* **11**: 855-863.
- Liptakova, A., Siegfried, L., Rosocha, J., Podracka, L., Bogyiova, E. and Kotulova, D. (2004) A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clin Microbiol Infect.* **10**: 576-578.
- Loirat, C., Baudouin, V., Sonsino, E., Mariani-Kurkdjian, P. and Elion, J. (1992) Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. In *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker*. Flammarion-Médecine-Sciences (ed.) Paris, pp. 133-158.
- Lopez, E.L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E, *et al* (1989) Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis.* **160**: 469-475.
- Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K., Rahn, K., Borczyk, A. and Lior, H. (1999) Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect.* **123**: 17-24.

- Louise, C.B. and Obrig, T.G. (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *Journal of Infections diseases*. **172**: 1397-1401.
- Ludwig, K., Petric, M., Blanchette, V. and Karmali, M. (1998) Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin Infect Dis*. **27**: 660-661.
- Ma, Z., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T. and Foster, J.W. (2002) Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol*. **184**: 7001-7012.
- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T. and Foster, J.W. (2003) GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. **49**: 1309-1320.
- MacDonald, D.M., Fyfe, M., Paccagnella, A., Trinidad, A., Louie, K. and Patrick, D. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiol and Infect*. **132**: 283-289.
- Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T, *et al* (2005) Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro Surveill*. **10**: E051222 051223.
- Marques, P.A., Worcman-Barninka, D., Lannes, S.C. and Landgraf, M. (2001) Acid tolerance and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in fruit pulps stored under refrigeration. *J Food Prot*. **64**: 1674-1678.
- Martin, D.R., Uhler, P.M., Okrend, A.J.G. and Chill, J.Y. (1994) Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot*. **57**: 70-72.
- Martinez, A., Oliva, J.M., Panella, E., Hernandez-Pezzi, G. and Soler, P. (2001) Outbreak of *E.coli* O157:H7 infection in Spain. *Euro Surveill Weekly*. **5**:1.
- Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V. and De Pace, R. (1997) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 degrees C. *Lett Appl Microbiol*. **24**: 347-350.
- Massa, S., Goffredo, E., Altieri, C. and Natola, K. (1999) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Lett Appl Microbiol* **28**: 89-92.
- Masuda, N. and Church, G.M. (2002) *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol*. **184**: 6225-6234.
- Masuda, N. and Church, G.M. (2003) Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **48**: 699-712.
- Mates, A.K., Sayed, A.K. and Foster, J.W. (2007) Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *J Bacteriol*. **189**: 2759-2768.
- Matthews, K.R., Murdough, P.A. and Bramley, A.J. (1997) Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. **82**: 197-203.
- McCarthy, T.A., Barrett, N.L., Hadler, J.L., Salsbury, B., Howard, R.T., Dingman, D.W., *et al* (2001) Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics*.

**108:** E59.

McDonald, C., Drew, J., Carlson, R., Dzogan, S., Tataryn, S. and McDonald, A. (2000) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 leading to the recall of retail ground beef --Winnipeg, Manitoba, May 1999. *Can Commun Dis Rep.* **13**: 109-111.

McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B. and Preston, T. (2002) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep.* **28**: 6-8.

McKellar, R.C. and Knight, K.P. (1999) Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. *J Food Prot.* **62**: 1466-1469.

Medellin-Pena, M.J. and Griffiths, M.W. (2009) Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 1165-1172.

Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol.* **33**: 296-306.

Meng, S.Y. and Bennett, G.N. (1992) Regulation of the *Escherichia coli* cad operon: location of a site required for acid induction. *J Bacteriol.* **174**: 2670-2678.

Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arne, P.D., Cerf, O. and 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.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M, *et al* (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol.* **150**: 787-796.

Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*

Millette, M. (2007) In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk *Lett Appl Microbiol.* **44**: 314-319.

Milne, L.M., Plom, A., Strudley, I., Pritchard, G.C., Crooks, R., Hall, M., *et al* (1999) *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health.* **2**: 22-26.

Mohle-Boetani, J.C., Farrar, J.A., Werner, S.B., Minassian, D., Bryant, R., Abbott, S, *et al* (2001) *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann Intern Med.* **135**: 239-247.

Molina, P.M., Sanz, M.E., Lucchesi, P.M.A., Padola, N.L. and Parma, A.E. (2005) Effects of acidic broth and juices on the growth and survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Food Microbiol.* **22**: 469-473.

Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. and Majid, F. (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect.* **111**: 181-187.

- Moschcowitz, E. (1925) An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med.* **36**: 89.
- Mosel, H.D. and Herrmann, K. (1974) Changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. *J Sci Food Agric.* **25**: 251-256.
- Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiology.* **24**: 82-88.
- Muthukumarasamy, P., Han, J. and Holley, R. (2003) Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. *J. Food Prot.* **66**: 2038-2044.
- Nadarajah, D., Han, J.H. and Holley, R.A. (2005) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *Int. J. Food Microbiol.* **99**: 269-279.
- Naim, F., Messier, S., Saucier, L. and Piette, G. (2003) A model study of *Escherichia coli* O157:H7 survival in fermented dry sausages-influence of inoculum preparation, inoculation procedure, and selected process parameters. *J Food Prot.* **66**: 2267-2275.
- Nakanishi, N., Abe, H., Ogura, Y., Hayashi, T., Tashiro, K., Kuhara, S, *et al* (2006) ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol Microbiol.* **61**: 194-205.
- Nauta, M.J. and Dufrenne, J. (1999) Variability in growth characteristics of different *E.coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol.* **1**: 137-155.
- Neely, M.N. and Olson, E.R. (1996) Kinetics of expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *J Bacteriol.* **178**: 5522-5528.
- Nicholls, L., Grant, T.H. and Robins-Browne, R.M. (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* **35**: 275-288.
- O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.B. (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* **146**: 763-769.
- O'Brien, S.J., Adak, G.K. and Gilham, C. (2001a) Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis.* **7**: 1049-1051.
- O'Brien, S.J., Murdoch, P.S., Riley, A.H., King, I., Barr, M., Murdoch, S., *et al* (2001b) A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H-phage type 8 in hospital. *J Hosp Infect.* **49**: 167-172.
- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M. and Pennington, T.H. (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol.* **34**: 100-104.
- Olsen, S.J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., *et al* (2002) A waterborne

outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis.* **8**: 370-375.

Opdyke, J.A., Kang, J.G. and Storz, G. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186**: 6698-6705.

Orskov, F., Orskov, I. and Villar, J.A. (1987) Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet.* **2**: 276.

Padhye, N.V. and Doyle, M.P. (1991) Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 2693-2698.

Pakalniskiene, J., Falkenhorst, G., Lisby, M., Madsen, S.B., Olsen, K.E., Nielsen, E.M., *et al* (2009) A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella Anatum* infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiol Infect.* **137**: 396-401.

Pal, A., Ghosh, S., Ramamurthy, T., Yamasaki, S., Tsukamoto, T., Bhattacharya, S.K., *et al* (1999) Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian J Med Res.* **110**: 83-85.

Pallen, M.J., Beatson, S.A. and Bailey, C.M. (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* **5**: 9.

Parish, E.M. (1997) Public health and nonpasteurized fruit juices. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**: 109-119.

Park, H.S., Marth, E.H. and Olson, N.F. (1973) Fate of enteropathogenic strain of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *J. Milk Food Technol.* **36**: 543-546.

Parry, S.M. and Salmon, R.L. (1998) Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis.* **4**: 657-661.

Paton, A.W. and Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol.* **36**: 598-602.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C. and Paton, J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* **69**: 6999-7009.

Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A. and Paton, J.C. (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **34**: 1622-1627.

Paunio, M., Pebody, R., Keskimaki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., *et al* (1999) Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect.* **122**: 1-5.

Pavia, A.T., Nichols, C.R., Green, D.P., Tauxe, R.V., Mottice, S., Greene, K.D., *et al* (1990) Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr.* **116**: 544-551.

Pebody, R.G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nylen, G., Ruutu, P., *et al* (1999) An



international outbreak of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect.* **123**: 217-223.

Phebus, R.K., L., N.A., Schafer, D.E., Wilson, R.C., Riemann, M.J., Leising, J.D, *et al* (1997) Comparison of steam pasteurization and other methods for reduction of pathogens on surfaces of freshly slaughtered beef. *J. Food Prot.* **60**: 476-484.

Pohl, P., Lintermans, B., Mainil, J. and Deprez, P. (1989) Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. *Annales de Médecine Vétérinaire.* **133**: 31-38.

Pradel, N., De Champs, C., Palcoux, J.B., Sirot, J., Forestier, C., Joly, B, *et al* (2000) [Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region]. *Arch. Pediatr.* **7 Suppl 3**: 544s-550s.

Preston, M., Borczyk, A. and Davidson, R. (1997) Hospital outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a rare phage type--Ontario. *Can Commun Dis Rep.* **23**: 33-36; discussion 36-37.

Price, S.B., Wright, J.C., DeGraves, F.J., Castanie-Cornet, M.P. and Foster, J.W. (2004) Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 4792-4799.

Price, S.B., Cheng, C.M., Kaspar, C.W., Wright, J.C., DeGraves, F.J., Penfound, T.A., *et al* (2000) Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 632-637.

Proctor, M.E., Kurzynski, T., Koschmann, C., Archer, J.R. and Davis, J.P. (2002) Four strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients during an outbreak of disease associated with ground beef: importance of evaluating multiple colonies from an outbreak-associated product. *J Clin Microbiol.* **40**: 1530-1533.

Rabatsky-Ehr, T., Dingman, D., Marcus, R., Howard, R., Kinney, A. and Mshar, P. (2002) Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg Infect Dis.* **8**: 525-527.

Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A. and Griffiths, M.W. (1998) Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* **81**: 1810-1817.

Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. and Swerdlow, D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* **11**: 603-609.

Read, S.C., Gyles, C.L., Clarke, R.C., Lior, H. and McEwen, S. (1990) Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect.* **105**: 11-20.

Reed, C. (1995) Challenge study - *Escherichia coli* O157:H7 in fermented sausage. *Letter to plant managers.* Washington, DC: US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.

Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. and Whittam, T.S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature.* **406**: 64-67.

Reida, P., Wolff, M. and Pohls, H.W. (1994) An outbreak due to *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol.* **281(4)**: 534-543.

Reinders, R.D., Biesterveld, S. and Bijker, P.G. (2001) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 in a model apple juice medium with different concentrations of proline and caffeic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2863-2866.

Reitsma, C.J. and Henning, D.R. (1996) Survival of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J. Food Prot.* **59**: 460-464.

Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyk, A., Spika, J.S., *et al* (1994) Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human--Ontario. *Can Commun Dis Rep.* **20**: 73-75.

Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* **3**: 59-67.

Rice, E.W., Johnson, C.H., Dunnigan, M.E. and Reasoner, D.J. (1995) Rapid Glutamate Decarboxylase Assay for Detection of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 847.

Richard, H. and Foster, J.W. (2004) *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol.* **186**: 6032-6041.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., *et al* (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* **308**: 681-685.

Riordan, D.C., Duffy, G., Sheridan, J., Eblen, B.S., Whiting, R.C., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of pepperoni. *J Food Prot* **61**: 146-151.

Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. and Leotta, G.A. (2006) [The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission]. *Medicina (B Aires).* **66 Suppl 3**: 27-32.

Rocelle, M., Clavero, S. and Beuchat, L.R. (1996) Survival of *E.coli* O157:H7 in broth and processed, salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2735-2740.

Ryu, J.H., Kim, H. and Beuchat, L.R. (2004) Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot.* **67**: 2123-2131.

Salmon, R. (2005) Outbreak of verotoxin producing *E.coli* O157 infections involving over forty schools in south Wales, September 2005. *Euro Surveill.* **10**: E051006 051001.

Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., *et al* (1994) Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 1038-1040.

Sandvig, K. (2001) Shiga toxins. *Toxicon.* **39**: 1629-1635.

Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forshell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., *et al* (2008) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of

fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiol Infect.* **136**: 370-380.

Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., *et al* (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis.* **173**: 1019-1022.

Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.M., Lassen, J., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T, *et al* (2008) Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis.* **8**: 41.

Schlesser, J.E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J. and Teo, A.Y. (2006) Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* **69**: 990-998.

Schuller, S., Frankel, G. and Phillips, A.D. (2004) Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol.* **6**: 289-301.

Sekla, L., Milley, D., Stackiw, W., Sisler, J., Drew, J. and Sargent, D. (1990) Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef--Manitoba. *Can Dis Wkly Rep.* **16**: 103-105.

Sharma, M., Richards, G.M. and Beuchat, L.R. (2004) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in roast beef and salami after exposure to an alkaline cleaner. *J Food Prot.* **67**: 2107-2116.

Shere, J.A., Bartlett, K.J. and Kaspar, C.W. (1998) Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 1390-1399.

Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C. and Kaper, J.B. (2001) An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol.* **41**: 1133-1150.

Shukla, R., Slack, R., George, A., Cheasty, T., Rowe, B. and Scutter, J. (1994) *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **5**: R86-90.

Shul'ga, A.A., Kurbanov, F.T., Khristoforov, R.R., Darii, E.L., Sukhareva, B.S. and . (1999) Glutamate decarboxylase of *Escherichia coli*: expression of *gadA* gene, purification and properties of GAD. *. Mol. Biol. (Moscow)* **33**: 560-566.

Siegler, R.L. (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am.* **42**: 1505-1529.

Skandamis, P.N. and Nychas, G.J. (2000) Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1646-1653.

Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (1996) pH-regulated genes and survival at acidic pH. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. **1**: 1539-1549.

Small, P.L.C. and Waterman, S.R. (1998) Acid stress, anaerobiosis and *gadCB*: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *. Trends Microbiol.* **6**: 214-216.

- Smith, D.K., Kassam, T., Singh, B. and Elliott, J.F. (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.* **174**: 5820-5826.
- Smith, H.R., Rowe, B., Adak, G. and Reilly, W. (1998) Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. In: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains* / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC: *Am Soc for Microbiol*: 49-58.
- Smith, H.R., Willshaw, G.A., Scotland, S.M., Thomas, A. and Rowe, B. (1993) Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from human and non-human sources. *Zentralbl Bakteriolog.* **278**: 436-444.
- Soderstrom, A., Lindberg, A. and Andersson, Y. (2005) EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill.* **10**: E050922 050921.
- Soderstrom, A., Osterberg, P., Lindqvist, A., Jonsson, B., Lindberg, A., Blide Ulander, S., *et al* (2008) A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathog Dis.* **5**: 339-349.
- Sofos, J.N. and Smith, G.C. (1998) Non acid meat decontamination technologies : Model studies and commercial applications *Int. J. of Food Microbiology.* **44**: 171-188.
- Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R. and Goni, F.M. (1999) Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol.* **31**: 1013-1024.
- Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy, A. and Massa, S. (2003) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Lett Appl Microbiol.* **36**: 73-76.
- Sperandio, V., Li, C.C. and Kaper, J.B. (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun.* **70**: 3085-3093.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A. and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* **183**: 5187-5197.
- Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Neves, B.C., Keller, R. and Trabulsi, L.R. (1998) Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett.* **164**: 133-139.
- Steele, B.T., Murphy, N., Arbus, G.S. and Rance, C.P. (1982) An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J Pediatr.* **101**: 963-965.
- Stephan, R. and Untermann, F. (1999) Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers. *J Clin Microbiol.* **37**: 1570-1572.
- Stevenson, J. and Hanson, S. (1996) Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **6**: R116-118.
- Stim-Herndon, K.P., Flores, T.M. and Bennett, G.N. (1996) Molecular characterization of *adiY*, a

regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*. **142** ( Pt 5): 1311-1320.

Strachan, N.J., Fenlon, D.R. and Ogden, I.D. (2001) Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett*. **203**: 69-73.

Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M. and Ogden, I.D. (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol*. **112**: 129-137.

Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. (1988) Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol*. **170**: 1116-1122.

Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*. **53**: 135-140.

Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., *et al* (2005) An outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Jpn J Infect Dis*. **58**: 398-400.

Sutcliffe, P., Picard, L., Fortin, B., Malaviarachchi, D., Hohenadel, J. and O'Donnell, B. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak at a summer hockey camp, Sudbury 2004. *Can Commun Dis Rep*. **30**: 189-194.

Suthienkul, O., Brown, J.E., Seriwatana, J., Tienthongdee, S., Sastravaha, S. and Echeverria, P. (1990) Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol*. **56**: 1135-1139.

Swerdlow, D.L. and Griffin, P.M. (1997) Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet*. **349**: 745-746.

Swofford, D.L. (2002) PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*

Takada, A., Umitsuki, G., Nagai, K. and Wachi, M. (2007) RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **71**: 158-164.

Tamblyn, S., deGrosbois, J., Taylor, D. and Stratton, J. (1999) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized non-commercial, custom-pressed apple cider--Ontario, 1998. *Can Commun Dis Rep*. **25**: 113-117; discussion 117-120.

Taormina, P.J., Beuchat, L.R. and Slutsker, L. (1999) Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg Infect Dis*. **5**: 626-634.

Tarr, P.I. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis*. **20**: 1-8; quiz 9-10.

Tarr, P.I., Tran, N.T. and Wilson, R.A. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot*. **62**: 133-139.

Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J.C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., *et al* (2000) *Iha* : a novel

- Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* **68**: 1400-1407.
- Thorpe, C.M., Smith, W.E., Hurley, B.P. and Acheson, D.W. (2001) Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun.* **69**: 6140-6147.
- Thran, B.H., Hussein, H.S., Hall, M.R. and Khaiboullina, S.F. (2001) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot.* **64**: 1613-1616.
- Tilden, J.J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., *et al* (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health.* **86**: 1142-1145.
- Tomoyasu, T., Takaya, A., Handa, Y., Karata, K. and Yamamoto, T. (2005) ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **253**: 59-66.
- Tozzi, A.E., Goriotti, S. and Caprioli, A. (2001) Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. In: Duffy G, Garvey P, McDowell DA, editors. Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull: 161-179.
- Tramonti, A., De Canio, M., Bossa, F. and De Biase, D. (2003) Stability and oligomerization of recombinant GadX, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamate decarboxylase system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1647**: 376-380.
- Tramonti, A., Visca, P., De Canio, M., Falconi, M. and De Biase, D. (2002) Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J Bacteriol.* **184**: 2603-2613.
- Trevena, W.B., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G. and Wray, C. (1999) Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and west Devon. *Commun Dis Public Health.* **2**: 263-268.
- Tsai, N.P., Wu, Y.C., Chen, J.W., Wu, C.F., Tzeng, C.M. and Syu, W.J. (2006) Multiple functions of I0036 in the regulation of the pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem J.* **393**: 591-599.
- Tsujihata, S., Entani, E., Asai, M., Tsukamoto, Y. and Ohta, M. (1998) Mathematical modeling to predict the bactericidal effect of processed vinegar on *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* **43**: 135-138.
- Tucker, D.L., Tucker, N. and Conway, T. (2002) Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 6551-6558.
- Tucker, D.L., Tucker, N., Ma, Z., Foster, J.W., Miranda, R.L., Cohen, P.S. and Conway, T. (2003) Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 3190-3201.
- Tunçel, G. and Nergiz, C. (1993) Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 300-302.
- Uljas, H.E. and Ingham, S.C. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in synthetic gastric fluid after cold and acid habituation in apple juice or trypticase soy broth acidified with hydrochloric acid or organic acids. *J Food Prot.* **61**: 939-947.

- Uyttendaele, M., Taverniers, I. and Debevere, J. (2001a) Effect of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **66**: 31-37.
- Uyttendaele, M., Jozwik, E., Tutenel, A., De Zutter, L., Uradzinski, J., Pierard, D. and Debevere, J. (2001b) Effect of acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of buffered lactic acid to decontaminate chilled beef tissue and effect of modified atmosphere packaging on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on red meat. *J Food Prot.* **64**: 1661-1666.
- Vernozy-Rozand, C. and Montet, M.P. (2001) *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Berardin, M., Bavai, C. and Beutin, L. (2005a) Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 235-241.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M.P., Bonin, V., Dernburg, A. and Richard, Y. (2005b) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 83-88.
- Vernozy-Rozand, C., Ray-Gueniot, S., Ragot, C., Bavai, C., Mazuy, C., Montet, M.P., *et al* (2002a) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. *Lett Appl Microbiol.* **35**: 7-11.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Bertin, Y., Trably, F., Girardeau, J.P., Martin, C., *et al* (2004) Serotyping, stx2 subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 2556-2559.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., *et al* (2002b) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 473-478.
- Vogel, H.J. and Bonner, D.M. (1956) Acetylmethylglutamate synthetase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem.* **218**: 97-106.
- Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. and Mandrell, R.E. (2002) Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot.* **65**: 18-25.
- Wadolowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E. and O'Brien, A.D. (1990) Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun.* **58**: 3959-3965.
- Ward, S., Delaquis, P., Holley, R. and Mazza, G. (1998) Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates. *Food Res. Int.* **31**: 19-26.
- Waterman, S.R. and Small, P.L. (1996) Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **64**: 2808-2811.
- Werber, D., Fruth, A., Liesegang, A., Littmann, M., Buchholz, U., Prager, R., *et al* (2002) A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J Infect Dis.* **186**: 419-422.
- Werber, D., Behnke, S.C., Fruth, A., Merle, R., Menzler, S., Glaser, S., *et al* (2007) Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am J Epidemiol.* **165**: 425-434.

Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I. and Wilson, R.A. (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* **61**: 1619-1629.

Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S. and Kaper, J.B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett.* **156**: 49-53.

Williams, R.C., Isaacs, S., Decou, M.L., Richardson, E.A., Buffett, M.C., Slinger, R.W., *et al* (2000) Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *E. coli* O157:H7 Working Group. *Cmaj.* **162**: 1409-1413.

Wu, F.M., Beuchat, L.R., Doyle, M.P., Garrett, V., Wells, J.G. and Swaminathan, B. (2002) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in coleslaw during storage. *J Food Prot* **65**: 845-847.

Yuk, H.G. and Marshall, D.L. (2004) Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied Environment Microbiology.* **70**: 3500-3505.

Zhao, T. and Doyle, M.P. (1994) Fate of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J Food Prot* **57**: 780-783.

Zhao, T., Doyle, M.P. and Besser, R.E. (1993) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 2526-2530.