



Bilan des connaissances relatives
aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines
(STEC)

- Avril 2003 -

Coordonnateurs de rédaction :

- **Mme Vernozzy-Rozand Christine**
- **Mme Roze Servane**

***E. coli* O157 :H7**

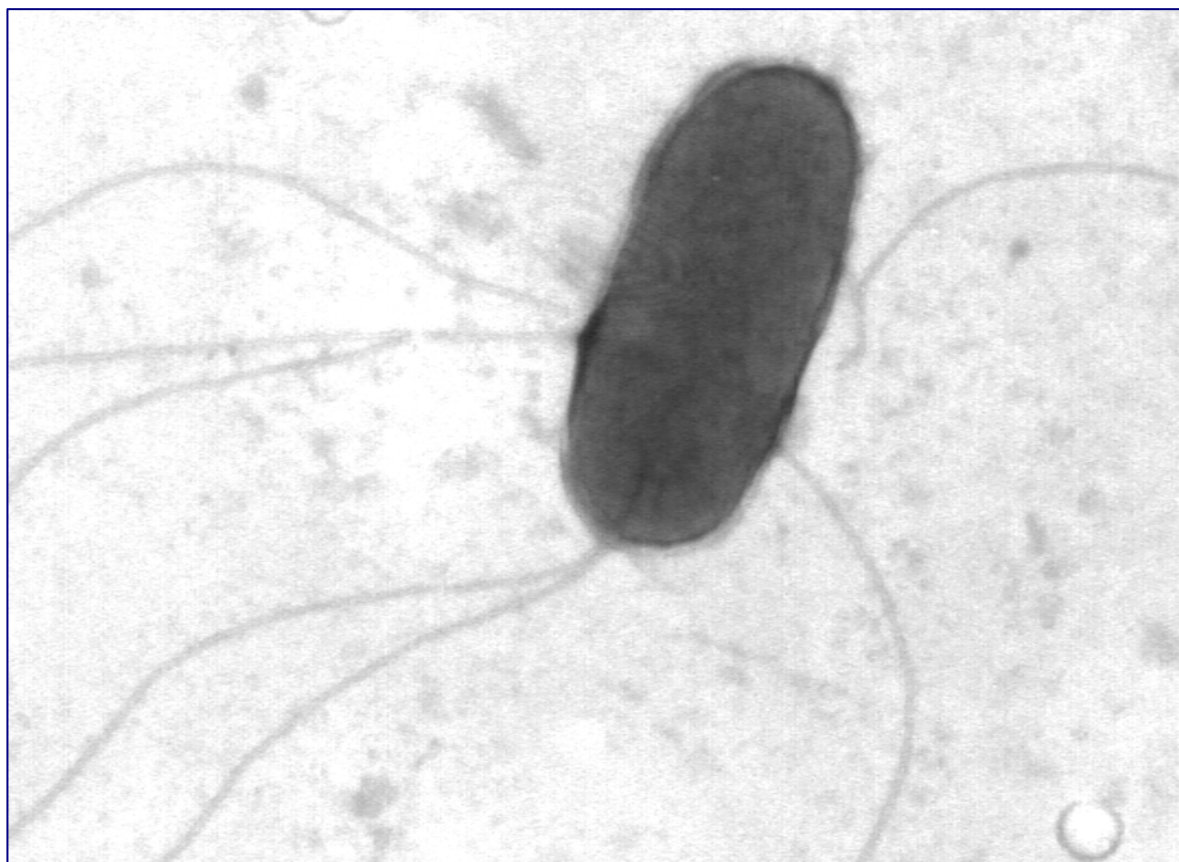


Illustration 1 : *E. coli* O157 :H7 en microscopie électronique, isolé à partir de matériel d'abattoir (B.Andral – HSRV / Afssa Lyon)

Composition du groupe de travail « STEC » de l'Afssa

Président

Mme Christine VERNOZY-ROZAND
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon - Lyon
CES Microbiologie

Membres

M. Bruno ANDRAL
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Pathologie bovine et Hygiène des Viandes
Afssa - Lyon

Mme Anne BRISABOIS
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort
CES Microbiologie

M. Hubert BRUGERE
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Toulouse
CES Microbiologie

Mme Marie-Laure DELIGNETTE-MULLER
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon - Lyon
CES Microbiologie

Mme Emmanuelle ESPIE
Département des Maladies Infectieuses
Institut national de Veille Sanitaire - Saint Maurice

M. Patrick FACH
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort

Mme Ines GIOVANNACCI
Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viande
Maisons-Alfort

Mme Francine GRIMONT
Centre National de référence des *Escherichia coli* et Shigella
Institut Pasteur - Paris

M. Vincent LECLERC
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort

Mme Valérie LIVRELLI
Faculté de pharmacie
Université d'Auvergne – Clermont Ferrand

Mme Patricia MARIANI-KURKDJIAN
Service de Microbiologie
Laboratoire associé au CNR
Hopital Robert Debré - Paris

M. Eric OSWALD
UMR 960 de Microbiologie Moléculaire INRA – Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Toulouse

M. Pierre PARDON
Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort - Maisons Alfort
CES Microbiologie

Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires

Mme Muriel ELIASZEWICZ
Unité d'évaluation des risques biologiques
Direction de l'évaluation des risques sanitaires et nutritionnels
Afssa - Maisons Alfort

Madame Aurore PETIT
Unité d'évaluation des risques biologiques
Direction de l'évaluation des risques sanitaires et nutritionnels
Afssa - Maisons Alfort

Madame Servane ROZE
Unité d'évaluation des risques biologiques
Direction de l'évaluation des risques sanitaires et nutritionnels
Afssa - Maisons Alfort

Personnalités consultées par le groupe de travail

M. Alain BARNIER
Inspecteur Hygiène et Sécurité
Afssa – Maisons Alfort

M. Lothar BEUTIN
Robert Koch Institut
Berlin – Allemagne

M. Jérôme BOUVET
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon - Lyon

Mme Brigitte CARPENTIER
Laboratoire d'Etudes et de Recherche pour l'Alimentation Collective
Afssa – Maisons Alfort
CES Matériau au contact des denrées alimentaires

Mme Marie CORNU
Laboratoire d'Etudes et de Recherche pour l'Alimentation Collective
Afssa – Maisons Alfort

M. Jean-Baptiste DENIS
Unité Biométrie et Intelligence Artificielle
INRA Jouy en Josas
CES Microbiologie

Mme Henriette DE VALK
Département des Maladies Infectieuses
Institut national de Veille Sanitaire - Saint Maurice

Mme Sylvie HAEGHEBAERT
Département des Maladies Infectieuses
Institut national de Veille Sanitaire - Saint Maurice

Mme Véronique LAFARGE
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort

Mme Chantal LOIRAT
Service de Néphrologie pédiatrique
Hôpital Robert Debré - Paris

M. Bertrand LOMBARD
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort

Mme Frédérique LE QUERREC
Direction générale de l'Alimentation
Sous direction de l'Hygiène des Aliments – Paris

M. François MANSOTTE
Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de Loire Atlantique
Nantes

Madame Sylvie PERELLE
Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hygiène et Qualité des Aliments
Afssa – Maisons Alfort

Mme Nathalie PRADEL
Laboratoire de chimie bactérienne
UPR9043, IBSM, CNRS - Marseille

M. Jacques RAFI
CEA – UMR 6171
Marseille

Mme Véronique VAILLANT
Département des Maladies Infectieuses
Institut national de Veille Sanitaire - Saint Maurice

Sommaire

Sommaire détaillé	13
Liste des abréviations	21
Nomenclature	21
Introduction	23
Section A : Historique et Définition des STEC	27
Points a retenir	27
Section B : Pathologie Humaine et Animale liée aux STEC	29
Points a retenir	29
Question n°1 : Quelles sont les différentes pathologies humaines à STEC ?.....	29
Question n°2 : Quelles sont les pathologies animales à STEC ?.....	36
Question n°3 : Que sait-on du portage Humain à STEC ?.....	36
Question n°4 : Existe-t-il des facteurs de sensibilité aux infections à STEC ?.....	37
Axes de réflexion et de recherche.....	39
Section C : Physiopathologie des maladies liées aux STEC	41
Points à retenir	41
Question n°5 : Que sait-on de la physiologie des infections à STEC ?.....	41
Question n°6 : Quels sont les facteurs de virulence des STEC ?	43
Question n°7 : Quels sont les éléments mobiles du genome des STEC et leur mode d'action ?.....	51
Question n°8 : Quels sont les éléments de phylogénie des STEC ?	55
Axes de réflexion et de recherche.....	59
Section D : Epidémiologie Humaine des STEC	61
Points a retenir	61
Question n°9 : Quel est le système de surveillance des infections à STEC en France ?	61
Question n°10 : Quels sont les principaux sérogroupes de STEC responsables d'infections chez l'homme ?.....	62
Question n°11 : Quelle est la répartition des différentes formes cliniques des infections à STEC ?.....	63
Question n°12 : Que sait-on des fluctuations saisonnières des infections à STEC ?	64
Question n°13 : Quelles sont les modes de transmission des STEC à l'homme ?.....	64
Question n°14 : Que sait-on de l'incidence des infections à STEC en France ? de son évolution au cours de ces dernières années ?.....	65
Question n°15 : Que sait-on de l'incidence des infections à STEC dans les autres pays ? de son évolution au cours des dernières années ?	65
Question n°16 : Qu'est ce qu'une épidémie d'infections à STEC ? Pourquoi les détecter et réaliser des investigations ?	67
Question n°17 : Quel est le schéma actuel d'une investigation d'épidémie en France ?.....	67
Question n°18 : Quels sont les aliments mis en cause lors des principales épidémies décrites?	68
Question n°19 : Quelles ont été les circonstances d'apparition et d'évolution des quatre épidémies majeures ayant influencé l'épidémiologie des infections à STEC ?.....	75
Question n°20 : Quels sont les aliments mis en cause par l'étude sur les facteurs de risque des infections à STEC sporadiques ?.....	76
Question n°21 : Quels sont les autres facteurs de risque connus des infections à STEC?.....	77
Axes de réflexion et de recherche.....	80

Section E : Epidémiologie Environnementale et Alimentaire des STEC	81
Points a retenir	81
Question n°22 : Que sait-on de la présence des STEC chez les animaux ?	84
Question n°23 : Que sait-on de la présence et de la survie des STEC dans l'environnement ?	90
Question n°24 : Que sait-on de la présence des STEC dans les différentes filières de transformation des denrées alimentaires ?	95
Question n°25 : Comment surveille-t-on les STEC en France, dans l'environnement et les aliments?.....	102
Axes de réflexion et de recherche.....	103
Section F : Isolement et Identification des STEC.....	105
Points à retenir	105
Question n°26 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et la détection des STEC dans les aliments ?	105
Question n°27 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement des STEC en médecine humaine ?.....	118
Question n°28 : Existe-t-il un diagnostic sérologique des infections à STEC chez l'homme ?	120
Axes de réflexion et de recherche.....	120
Section G : Physiologie des STEC	121
Points à retenir	121
Question n°29 : Que sait-on du comportement des STEC vis-à-vis des principaux facteurs physico-chimiques ?	122
Question n°30 : Que sait-on du comportement des STEC lors du conditionnement des denrées alimentaires et lors de l'utilisation de conservateurs et d'additifs ?.....	129
Question n°31 : Que sait-on de la résistance des STEC aux procédés physiques et aux nouvelles technologies de décontamination des aliments ?	134
Question n°32 : Que sait-on des interactions entre les STEC et les autres micro-organismes dans les aliments ?	137
Question n°33 : Que sait-on de la capacité des STEC à adhérer et à former des biofilms?	139
Question n°34 : Que sait-on de la résistance des STEC à la désinfection, en comparaison avec d'autres bactéries ?	142
Axes de réflexion et de recherche.....	144
Section H : Microbiologie Prévisionnelle.....	145
Points a retenir	145
Question n°35 : Quels sont les différents modèles utilisés pour modéliser la croissance ?	145
Question n°36 : Quels sont les différents Types de modèles utilisés pour décrire une cinétique de croissance dans des conditions données ?	146
Question n°37 : Quels sont les différents modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le taux de croissance ?	147
Question n°38 : Quels sont les différents modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le temps de latence ?.....	152
Question n°39 : Comment modélise-t-on la limite croissance/non croissance en fonction des facteurs environnementaux?	152
Question n°40 : Quels sont les modèles d'inactivation thermique disponibles?	153
Question n°41 : Quels sont les modèles d'inactivation non-thermique disponibles?	155
Axes de réflexion et de recherche.....	156

Section I : Relation dose-réponse	157
Points à retenir	157
Question n°42 : Quel est le contexte de l'établissement de la relation dose-réponse ?	157
Question n°43 : Quelles sont les principales évaluations de relations dose-réponse réalisées pour les STEC ?	159
Question n°44 : De quelles données dispose-t-on pour évaluer la dose infectieuse ?	162
Question n°45 : Quelles sont les principales limites liées à l'évaluation de la relation dose-réponse?	164
Axes de réflexion et de recherche.....	167
Section J : Réglementation, Mesures de Gestion et Action de Communication sur le risque STEC en France et en Europe	169
Points à retenir	169
Question n°46 : Quelle est la législation européenne concernant les STEC et comment est-elle transposée en France ?	169
Question n°47 : Quelles sont les mesures de gestion ou les actions de communication déjà mises en œuvre dans le cadre de la prévention du risque relatif aux STEC ?	172
Axes de réflexion et de recherche.....	174
Bibliographie.....	177

Sommaire détaillé

Sommaire	9
Liste des abréviations	21
Nomenclature	21
Introduction	23
1 Contexte et Justification du projet	23
2 Méthodologie	24
2.1 Groupe de travail	24
2.2 Méthodes de travail	24
2.3 Bilan et perspectives	25
Section A : Historique et Définition des STEC	27
Points a retenir	27
Section B : Pathologie Humaine et Animale liée aux STEC	29
Points a retenir	29
Question n°1 : Quelles sont les différentes pathologies humaines à STEC ?	29
1 Colite hémorragique	31
2 Syndrome hémolytique et urémique (SHU)	31
2.1 Aspects cliniques	32
2.2 Anatomopathologie	32
2.3 Conduite à tenir	33
2.4 Traitement symptomatique	33
2.5 Pronostic	33
3 Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT)	34
3.1 Manifestations cliniques	34
3.2 Pathogénie	35
3.3 Diagnostic	35
3.4 Traitement et pronostic	35
4 Nouveaux aspects cliniques	35
5 Traitements des infections à STEC	35
Question n°2 : Quelles sont les pathologies animales à STEC ?	36
Question n°3 : Que sait-on du portage Humain à STEC ?	36
Question n°4 : Existe-t-il des facteurs de sensibilité aux infections à STEC ?	37
Axes de réflexion et de recherche	39
Section C : Physiopathologie des maladies liées aux STEC	41
Points à retenir	41
Question n°5 : Que sait-on de la physiologie des infections à STEC ?	41
Question n°6 : Quels sont les facteurs de virulence des STEC ?	43
1 Les Shiga-toxines	43
1.1 Structure des Shiga-toxines	43
1.2 Mécanismes de sécrétion des Shiga-toxines	43
1.3 Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cible	43
1.4 Différents variants de Shiga-toxines identifiés	44
1.5 Mécanismes de traversée l'épithélium intestinal de Shiga-toxines	45
1.6 Rôle des toxines dans la physiopathologie	45
1.7 Modèles animaux expérimentaux ?	46

2	Les facteurs d'adhésion	46
2.1	Lésions d'attachement-effacement.....	46
2.2	Locus d'effacement des entérocytes (LEE).....	47
2.3	Régulation de l'expression des gènes du LEE	48
2.4	Différences entre les EPEC et les EHEC	48
2.5	Autres facteurs d'adhésion décrits.....	48
2.6	Rôle du lipopolysaccharide (LPS) dans l'adhésion	49
2.7	Implication des plasmides de haut poids moléculaire dans l'adhésion	49
3	L'entérohémolysine	49
3.1	Structure et mécanisme d'action de l'entérohémolysine (E-hlyA).....	49
3.2	Rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité des STEC.....	49
3.3	Autres facteurs plasmidiques jouant un rôle dans la pathogénicité des STEC.....	50
3.4	Rôle de l'entérotoxine EAST1 dans la pathogénicité des STEC.....	50
3.5	Implication des mécanismes de captation du fer dans la pathogénicité des STEC.....	50
3.6	Rôle éventuel de la résistance à l'acidité dans le processus infectieux.....	50
3.7	Rôle éventuel de l'uréase dans la pathogénicité des STEC	50
	Question n°7 : Quels sont les éléments mobiles du genome des STEC et leur mode d'action ?.....	51
1	Les bactériophages.....	51
1.1	Phages codant les toxines Stx.....	51
1.2	Phages dans la régulation de l'expression des toxines Stx	52
1.3	Transduction des gènes <i>stx</i>	53
2	Les îlots de pathogénicité	53
2.1	PAI décrits chez les STEC.....	54
2.2	Rôle des PAI dans la régulation	54
3	Les plasmides	54
3.1	Plasmide pO157	54
3.2	Plasmides de STEC de sérotypes non-O157:H7	54
4	Les vésicules membranaires	55
	Question n°8 : Quels sont les éléments de phylogénie des STEC ?	55
1	Origine de l'espèce <i>E. coli</i>	55
2	Origine des EHEC.....	55
3	Origine du clone O157	56
3.1	Relations clonales entre les souches O157:H7.....	57
3.2	Relations clonales entre les STEC de sérotypes non-O157:H7.....	57
4	Evolution des gènes de pathogénicité des STEC.....	57
5	Analyse comparative du génome des souches EHEC EDL 933 et Sakai.....	58
	Axes de réflexion et de recherche.....	59
	Section D : Epidémiologie Humaine des STEC.....	61
	Points a retenir	61
	Question n°9 : Quel est le système de surveillance des infections à STEC en France ?.....	61
	Question n°10 : Quels sont les principaux sérogroupes de STEC responsables d'infections chez l'homme ?.....	62
1	En France.....	62
2	En Europe	63
3	Dans les autres pays	63
	Question n°11 : Quelle est la répartition des différentes formes cliniques des infections à STEC ?.....	63
	Question n°12 : Que sait-on des fluctuations saisonnières des infections à STEC ?.....	64
	Question n°13 : Quelles sont les modes de transmission des STEC à l'homme ?.....	64
1	Transmission alimentaire :	64
2	Transmission hydrique.....	64
3	Transmission inter-humaine.....	64
4	Contact avec des animaux de ferme et leur environnement	65
5	Contamination de laboratoire.....	65
	Question n°14 : Que sait-on de l'incidence des infections à STEC en France ? de son évolution au cours de ces dernières années ?.....	65

Question n°15 : Que sait-on de l'incidence des infections à STEC dans les autres pays ? de son évolution au cours des dernières années ?	65
1 Incidence des infections à STEC et du SHU en Europe.....	66
2 Incidence des infections à STEC et du SHU dans les autres pays	66
Question n°16 : Qu'est ce qu'une épidémie d'infections à STEC ? Pourquoi les détecter et réaliser des investigations ?	67
Question n°17 : Quel est le schéma actuel d'une investigation d'épidémie en France ?.....	67
Question n°18 : Quels sont les aliments mis en cause lors des principales épidémies décrites?	68
1 En France.....	69
2 En Europe et Amérique du Nord.....	69
Question n°19 : Quelles ont été les circonstances d'apparition et d'évolution des quatre épidémies majeures ayant influencé l'épidémiologie des infections à STEC ?.....	75
1 Premières épidémies d'infections à <i>E. coli</i> O157:H7, Etats-Unis, 1982.....	75
2 Épidémie d'infections à <i>E. coli</i> O157:H7 liée à de la viande de bœuf, Écosse, 1996.....	75
3 Épidémies d'infections à <i>E. coli</i> O157:H7, liée à des végétaux, Japon, 1996.....	75
4 Epidémie d'infections à <i>E. coli</i> O157:H7, liée à de l'eau de boisson, Canada, 2000.....	76
Question n°20 : Quels sont les aliments mis en cause par l'étude sur les facteurs de risque des infections à STEC sporadiques ?.....	76
1 En France.....	76
2 En Europe et Amérique du Nord.....	76
Question n°21 : Quels sont les autres facteurs de risque connus des infections à STEC?.....	77
Axes de réflexion et de recherche.....	80
Section E : Epidémiologie Environnementale et Alimentaire des STEC	81
Points a retenir	81
Question n°22 : Que sait-on de la présence des STEC chez les animaux ?	84
1 Portage et excrétion de STEC par les ruminants d'élevage.....	84
1.1 Prévalence et excrétion de STEC par les ruminants d'élevage	84
1.2 Persistance du portage et quantité de STEC excrétée par les ruminants d'élevage.....	86
1.3 Influence du mode d'abreuvement des animaux ou de leur alimentation sur le portage et l'excrétion	88
2 Portage et excrétion par les autres animaux d'élevage et les animaux familiers.....	89
3 Portage et excrétion de STEC par les animaux sauvages	90
Question n°23 : Que sait-on de la présence et de la survie des STEC dans l'environnement ?	90
1 Dans les fèces.....	91
2 Dans les fumiers et les lisiers	91
3 Sur ou dans le sol	92
4 Dans l'eau de ruissellement et/ou de lessivage des sols après épandage	93
5 Dans les eaux usées.....	93
6 Dans les eaux de surfaces et les eaux profondes.....	94
7 Dans le réseau de distribution d'eau potable.....	94
Question n°24 : Que sait-on de la présence des STEC dans les différentes filières de transformation des denrées alimentaires ?	95
1 Dans les filières de transformation des viandes	95
1.1 Viandes bovines	95
1.2 Viandes de petits ruminants	96
1.3 Viandes porcines	96
1.4 Viandes de volailles	97
2 Dans les filières lait et produits laitiers.....	99
3 Dans les filières produits de la pêche	100
4 Dans les filières végétales	100
Question n°25 : Comment surveille-t-on les STEC en France, dans l'environnement et les aliments ?.....	102
1 Dans l'environnement	102
2 Dans les aliments.....	102
Axes de réflexion et de recherche.....	103

Section F : Isolement et Identification des STEC	105
Points à retenir	105
Question n°26 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et la détection des STEC dans les aliments ?.....	105
1 Méthodes biochimiques de détection et d'isolement des STEC.....	105
1.1 Propriétés biochimiques de <i>E. coli</i> O157:H7 ?.....	105
1.2 Confirmation des colonies suspectes <i>E. coli</i> O157:H7.....	106
1.2.1 Utilisation de méthodes phénotypiques en confirmation.....	106
1.2.2 Utilisation de méthodes génétiques en confirmation.....	106
1.3 Particularités biochimiques des STEC non-O157	108
2 Tests immunologiques de détection des STEC dans l'aliment.....	108
2.1 Tests immunologiques de détection de <i>E. coli</i> O157:H7 ?.....	108
2.1.1 Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA	109
2.1.2 Systèmes automatisés	109
2.1.3 Résultats et interprétation.....	109
2.1.4 Tests immunologiques validés AFNOR de détection des <i>E. coli</i> O157:H7.....	110
2.2 Tests immunologiques de détection des STEC non-O157	114
3 Méthodes génétiques de détection des STEC dans les aliments	114
4 Limites de ces méthodes	117
4.1 Dénombrement	117
4.2 Influence du stress et des formes Viables Non Cultivables (VNC)	117
Question n°27 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement des STEC en médecine humaine ?.....	118
1 Méthodes biochimiques et immunologiques de détection des STEC.....	118
2 Méthodes génétiques de détection des STEC	119
Question n°28 : Existe-t-il un diagnostic sérologique des infections à STEC chez l'homme ?.....	120
Axes de réflexion et de recherche.....	120
 Section G : Physiologie des STEC	 121
Points à retenir	121
Question n°29 : Que sait-on du comportement des STEC vis-à-vis des principaux facteurs physico-chimiques ?	122
1 Température.....	122
1.1 Effet de la température sur la croissance	122
1.2 Résistance aux traitements thermiques	122
1.3 Effet de la congélation et de la décongélation.....	124
1.3.1 Viandes, lait et œufs	124
1.3.2 Fruits et jus de fruits	125
2 pH.....	125
2.1 pH et croissance : pHopt, pHmax et pHmin	125
2.2 Différence d'action entre les acides minéraux et les acides organiques.....	125
2.3 Résistance des STEC aux pH très acides.....	126
2.3.1 Mécanismes d'adaptation à l'acidité.....	126
2.3.2 Variabilité de sensibilité des souches aux pH acides.....	127
2.3.3 Effet de la matrice (formulation) et de l'environnement de stockage sur la résistance à l'acidité.....	127
3 a _w	128

Question n°30 : Que sait-on du comportement des STEC lors du conditionnement des denrées alimentaires et lors de l'utilisation de conservateurs et d'additifs ?.....	129
1 Influence du mode de conditionnement des produits (sous air, sous vide et sous atmosphère modifiée) sur le comportement des STEC.....	129
2 Influence des produits utilisés comme conservateurs et autres additifs alimentaires à effet antimicrobien sur le comportement des STEC.....	129
2.1 Nitrites.....	129
2.2 Acides organiques.....	130
2.2.1 Acides sorbique, benzoïque et fumarique.....	130
2.2.2 Acides organiques produits par la flore annexe.....	131
2.3 Bactériocines.....	131
2.4 Phosphates et Polyphosphates.....	131
2.5 Substances antimicrobiennes produites par les plantes.....	131
2.6 Molécules utilisées pour la décontamination de surface des viandes et des végétaux.....	132
2.6.1 Utilisation des acides organiques.....	132
2.6.2 Utilisation de composés chlorés.....	133
Question n°31 : Que sait-on de la résistance des STEC aux procédés physiques et aux nouvelles technologie de décontamination des aliments ?.....	134
1 Ionisation.....	134
2 Rayons X pulsés ou Pulsed X-Ray.....	135
3 Rayonnements UV.....	135
4 Hautes pressions.....	135
5 Ozone.....	136
Question n°32 : Que sait-on des interactions entre les STEC et les autres micro-organismes dans les aliments ?.....	137
1 Bactériocines produites par les <i>Enterobacteriaceae</i>	137
2 Bactériocines produites par les bactéries lactiques.....	138
2.1 Nisine.....	138
2.2 Reutérine.....	138
Question n°33 : Que sait-on de la capacité des STEC à adhérer et à former des biofilms?.....	139
1 Caractéristiques cellulaires impliquées dans l'adhésion et la formation de biofilm.....	139
1.1 Caractéristiques physico-chimiques.....	139
1.2 Fimbriae.....	139
2 Etude de la formation de biofilms dans les conditions simulant des situations de terrain....	140
2.1 Adhésion et formation de biofilm sur acier inoxydable en présence de nutriments d'origine carnée, comparaison avec d'autres milieux de culture.....	140
2.2 Adhésion et formation de biofilm dans des conditions stimulant des conduites d'eau, comparaison de divers matériaux.....	141
2.3 Adhésion et formation de biofilms sur des surfaces végétales (graine et germe de luzerne, laitue, melon, pomme).....	141
2.3.1 Comparaison de <i>E. coli</i> O157:H7 avec d'autres bactéries pathogènes.....	141
2.3.2 Zone d'adhésion préférentielle.....	141
Question n°34 : Que sait-on de la résistance des STEC à la désinfection, en comparaison avec d'autres bactéries ?.....	142
1 Essais réalisés sur des cellules en suspension.....	142
1.1 Désinfectant de l'eau : le chlore.....	142
1.2 Désinfectants pour l'industrie agro-alimentaire.....	142
1.3 Désinfectants et antiseptiques utilisés en milieu hospitalier.....	143
2 Essais réalisés en suspension et en biofilm sur des surfaces inertes.....	143
3 Essais de désinfection des végétaux.....	143
4 Etat physiologique après désinfection.....	143
Axes de réflexion et de recherche.....	144

Section H : Microbiologie Prévisionnelle.....	145
Points a retenir	145
Question n°35 : Quels sont les différents modèles utilisés pour modéliser la croissance ?	145
Question n°36 : Quels sont les différents Types de modèles utilisés pour décrire une cinétique de croissance dans des conditions données ?	146
Question n°37 : Quels sont les différents modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le taux de croissance ?	147
1 Modèles de croissance de type polynomiaux	148
2 Modèles de croissance de type racine carrée	149
2.1 Effet de la température	149
2.2 Effet du pH	150
2.3 Effet de l'aw	150
3 Illustration.....	150
Question n°38 : Quels sont les différents modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le temps de latence ?	152
Question n°39 : Comment modélise-t-on la limite croissance/non croissance en fonction des facteurs environnementaux?	152
Question n°40 : Quels sont les modèles d'inactivation thermique disponibles?	153
Question n°41 : Quels sont les modèles d'inactivation non-thermique disponibles?	155
Axes de réflexion et de recherche.....	156
Section I : Relation dose-réponse	157
Points à retenir	157
Question n°42 : Quel est le contexte de l'établissement de la relation dose-réponse ?	157
1 Relation dose-réponse et analyse des risques.....	157
2 Données théoriques nécessaires à l'établissement de la relation dose-réponse.....	158
3 Approche pratique utilisée pour modéliser la relation dose-réponse.....	158
Question n°43 : Quelles sont les principales évaluations de relations dose-réponse réalisées pour les STEC ?.....	159
Question n°44 : De quelles données dispose-t-on pour évaluer la dose infectieuse ?	162
1 Données provenant d'épidémies	162
2 Données provenant d'infections volontaires ou accidentelles sur des humains	163
3 Données provenant d'infections expérimentales d'animaux	163
Question n°45 : Quelles sont les principales limites liées à l'évaluation de la relation dose-réponse?	164
1 Limites liées à l'utilisation de modèles mathématiques	164
2 Limites liées à la qualité des données épidémiologiques recueillies pour valider les relations dose-réponse.....	165
3 Limites liées à la qualité des données microbiologiques recueillies pour valider les relations dose-réponse.....	165
Axes de réflexion et de recherche.....	167
Section J : Réglementation, Mesures de Gestion et Action de Communication sur le risque STEC en France et en Europe	169
Points à retenir	169
Question n°46 : Quelle est la législation européenne concernant les STEC et comment est-elle transposée en France ?	169
1 Législation existante dans le cadre des aliments, de l'animal ou de l'environnement	170
1.1 Directives européennes	170
1.2 Réglementation française	171
2 Législation existante dans le cadre de la manipulation des souches en laboratoire	171
Question n°47 : Quelles sont les mesures de gestion ou les actions de communication déjà mises en œuvre dans le cadre de la prévention du risque relatif aux STEC ?	172
1 Exemples de mesures de gestion du risque appliquées en Europe.....	172
2 Exemples d'actions de communication sur le risque appliquées en Europe.....	173
Axes de réflexion et de recherche.....	174

Bibliographie..... 177

Liste des figures :

Figure 1 : Evolutions cliniques après ingestion de STEC	30
Figure 2 : Principales étapes du processus infectieux des STEC d'après M. Soriani (Heyderman <i>et al.</i> , 2001) adapté par V. Livrelli. Après ingestion des STEC, une étape de colonisation du tube digestif est probable. Les toxines traversent l'épithélium intestinal par transcytose, avant de rejoindre le système circulatoire. Elles peuvent alors atteindre les récepteurs spécifiques (Gb3) localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral.	42
Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de Pradel, 2001). Les STEC possèdent sur leur chromosome des bactériophages portant les gènes <i>stxA</i> et <i>B</i> . La toxine comporte 1 sous-unité A et 5 sous-unités B. Après fixation de la toxine sur le récepteur Gb3 à la surface des cellules eucaryotes, internalisation, transport rétrograde et translocation, l'activité N- glycosidase de la sous-unité A1 sur l'ARN 28S entraîne une inhibition totale des synthèses protéiques et donc la mort de la cellule.	44
Figure 4 : Rôle synergique des Shiga-toxines et des cytokines (d'après Tatewaki, 2000). Stx induirait la production de cytokines par les macrophages et les monocytes (TNF- α , IL-1 β , IL-12...). Les cytokines induiraient alors la production de Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de Stx. L'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC permettrait le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et ainsi la dissémination systémique des toxines et favoriserait l'évolution vers un SHU.	46
Figure 5 : Les lésions d'attachement effacement (A/E). Observation par microscopie électronique des lésions A/E de la souche EPEC de référence E2348/69 sur des entérocytes humains (Knutton <i>et al.</i> , 1987). Ces lésions sont caractérisées par un effacement des microvillosités, et par une accumulation d'actine cellulaire sous-jacente à la bactérie, et formant un piédestal.	47
Figure 6 : Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus sont portés par les éléments mobiles du génome (d'après P. Mariani et V. Livrelli) : les gènes codant les toxines Stx (<i>stxA</i> , <i>stxB</i>) par des bactériophages, les gènes codant les fonctions d'attachement/effacement par l'îlot de pathogénicité LEE ; les gènes <i>espP</i> , <i>katP</i> , <i>ehxA</i> sont plasmidiques	51
Figure 7 : Morphologie des deux bactériophages, support des gènes codants les Shiga-toxines Stx 1 et Stx 2 (d'après Ackermann and Dubow, 1987).	52
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation génomique des phages λ (a) et H-19B (b) (V. Livrelli, N. Pradel, d'après Waldor, 1998). Les gènes codant Stx1 (<i>stx_{1A}</i> , <i>stx_{1B}</i>) sont localisés en aval d'un gène homologue à celui de l'anti-terminateur de transcription Q de λ , suivi du promoteur tardif pR' et du terminateur de transcription tR'. Le promoteur localisé immédiatement en amont des gènes <i>stx</i> est également représenté. Les gènes S, R et Rz correspondent aux gènes de lyse. Les transcrits en présence et en absence de l'anti-terminateur Q sont représentés par des flèches situées en bas de la figure	53
Figure 9 : Modèle hypothétique de l'émergence de <i>E. coli</i> O157:H7 basé sur les mutations dans le gène <i>uidA</i> , la production de vérotoxine et les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase (Feng <i>et al.</i> , 1998)	56
Figure 10 : Schéma actuel d'une investigation lors de cas groupés de SHU en France	68
Figure 11 : Répartition géographique des épidémies d'infections à STEC dans le monde (avec les modes de transmissions identifiés)	70
Figure 12 : Flux potentiels de STEC (H.Brugere-ENV de Toulouse).- Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent représenter les animaux d'élevage et l'homme. La transmission des STEC est possible :	83
Figure 13 : Protocole de recherche de <i>E. coli</i> O157 dans l'aliment : méthode VIDAS	112

Figure 14 : Mode opératoire IMS (Norme ISO EN-16654).....	113
Figure 15 : Ajustement de deux modèles primaires de croissance classiques sur une cinétique de croissance d'une souche de <i>E. coli</i> O157:H7 en bouillon, mesurée par dénombrement sur boîte de Petri.....	147
Figure 16 : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec le modèle polynomial de Buchanan et Bagi (1994).....	151
Figure 17 : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec un modèle de type racine carrée.....	151
Figure 18 : Interfaces croissance-non croissance décrite par le modèle de McKellar et Lu (2001) ...	153
Figure 19 : « <i>Beta-Binomial dose-response model - Uncertainty in average probability of illness vs ingested dose of E. coli O157:H7.</i> » Traduit par l'Afssa en : Modèle dose-réponse Bêta-Binomiale incluant la variabilité en ce qui concerne la probabilité d'être malade selon la dose ingérée de cellules de <i>E. coli</i> O157:H7(d'après Cassin <i>et al.</i> , 1998 avec l'autorisation d'Elsevier).....	160
Figure 20 : Enveloppe de la relation dose-réponse pour <i>E. coli</i> O157:H7. Les limites de cette enveloppe sont définies par la relation dose-réponse ajustée sur des données humaines associées à <i>Shigella</i> ou à des EPEC (d'après Powell <i>et al.</i> , 2000).....	161
Figure 21 : Ajustement de 5 relations dose-réponse sur la base de données provenant d'une épidémie japonaise liée à <i>E. coli</i> O157:H7 en 1996. Le cercle représente la valeur provenant de l'épidémie ($P_{inf} = 0.25$, dose moyenne ingérée = 1,49 \log_{10}). Cette valeur est ajustée aux modèles hypergéométrique et exponentiel (d'après Nauta <i>et al.</i> , 2001).....	162

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Systèmes de surveillance ou sources de données sur les infections à STEC ou des SHU dans les pays européens (année de mise en place) (Ammon, 1997; WHO, 1997).....	66
Tableau 2 : Épidémies d'infections à STEC liées à la consommation d'aliments contaminés et recensées depuis 1982, classés en fonction des types d'aliment (produits carnés, produits laitiers, végétaux).....	71
Tableau 3 : Épidémies d'infections à STEC liées à la consommation d'eau de distribution contaminée et recensées depuis 1989.....	74
Tableau 4 : Facteurs de risque mis en évidence par les études de type « cas-témoins » sur la survenue d'infections à STEC, 1985-2001.....	77
Tableau 5 : Facteurs de risque associés à des infections à STEC (autres que alimentaires), mis en cause par des études analytiques, 1990-2001.....	78
Tableau 6 : Facteurs de risques associés à des infections à STEC (autres que alimentaires), mis en cause par des études de cas sporadiques ou des investigations d'épidémies*, 1989-2000.....	79
Tableau 7 : Présence des STEC dans les viandes.....	98
Tableau 8 : Présence de <i>E. coli</i> O157:H7 dans les viandes.....	99
Tableau 9 : Résultats des études concernant la recherche de <i>E. coli</i> O157 (1995-1999) ou de STEC (2000-2001) dans diverses matrices alimentaires (d'après Leclerc <i>et al.</i> , (2003)).....	103
Tableau 10 : Kits immunologiques de détection de <i>E. coli</i> O157:H7 dans l'aliment (Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2002).....	110
Tableau 11 : Kit d'immunoconcentration de <i>E. coli</i> O157 dans l'aliment (Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2002).....	111
Tableau 12 : Thermorésistance des STEC estimée dans diverses matrices alimentaires.....	124
Tableau 13 : Modèles secondaires polynomiaux proposés pour <i>E. coli</i> O157:H7.....	149
Tableau 14 : Modèles secondaires d'inactivation thermique proposés pour <i>E. coli</i> O157:H7.....	154
Tableau 15 : Modèles d'inactivation non thermiques proposés pour <i>E. coli</i> O157:H7.....	155

Liste des abréviations

AFNOR	: Association française de normalisation
EHEC	: <i>Escherichia coli</i> enterohémorragique
EIEC	: <i>Escherichia coli</i> entéroinvasif
EPEC	: <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène
ETEC	: <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène
IRC	: Insuffisance rénale chronique
ICE	: Immunoconcentration automatique
IMS	: Séparation Immunomagnétique
LEE	: Locus of Enterocyte Effacement
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Electrophorèse en champ pulsé
PTT	: Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
RD	: Réduction Décimale
SHU	: Syndrome Hémolytique et Urémique
STEC	: Shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i> (ancien nom : VTEC)
SYM Previus	: Système de prévision du comportement des micro-organismes dans les aliments / France
TIAC	: Toxi infection alimentaire collective
ufc	: unité formant colonie

Nomenclature

Convention d'écriture utilisée dans ce rapport (d'après Calderwood S. *et al.* (1996))

	<u>Gène</u>	<u>Toxine</u>
Shiga-toxine ou vérotoxine	<i>stx</i>	Stx
Shiga-toxine 1 ou vérotoxine 1, 2, 2 _c ,	<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>stx</i> _{2c} , ...	Stx1, Stx 2, Stx 2c, ...

Introduction

1 Contexte et Justification du projet

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines sont considérés par la communauté scientifique comme des pathogènes émergent importants en santé publique. Ils ont été à l'origine en 1982 aux Etats-Unis de deux épidémies de colite hémorragique sévère, nécessitant une hospitalisation de 70 % des malades. Des hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide ont été impliqués avec mise en évidence une souche de *E. coli* d'un sérotype particulier : O157:H7.

Depuis 1982, de nombreux autres cas d'infections humaines consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des STEC ont été rapportés à travers le monde.

En France, une centaine de cas de SHU majoritairement liés à des STEC, sont recensés par an, chez les enfants de moins de 15 ans depuis 1995. Les chiffres pour les adultes sont inconnus. Récemment, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été détectées et investiguées : une première en décembre 2000, liée à *E. coli* O157 et une seconde en juin 2002, liée à un STEC non O157 incriminant de la viande de mouton.

Ainsi les STEC et plus particulièrement le sérotype O157:H7 représentent un danger pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agro-alimentaires. Ce contexte a justifié pleinement de faire un bilan des connaissances scientifiques sur les STEC, de manière à pouvoir proposer des recommandations pertinentes de maîtrise de ce danger, et d'identifier par la même occasion les champs de recherche.

C'est dans ce contexte général que le comité d'experts « Microbiologie » de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, sous l'impulsion de Monsieur le Professeur Flandrois, président de ce comité, a rédigé différentes fiches de description des pathogènes d'intérêt en sécurité sanitaire des aliments ; parmi elles, figurait la fiche « *Escherichia coli* O157 :H7 »¹.

Le 12 juin 2001, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la Direction générale de l'alimentation et la Direction générale de la santé, d'une demande d'avis relative aux caractéristiques à retenir pour considérer qu'une souche de *Escherichia coli* vérocytotoxique est potentiellement pathogène pour l'homme.

Sur le fondement de l'expertise scientifique menée par le Comité d'experts spécialisé «Microbiologie», l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a émis l'avis suivant :

- « 1. L'Agence estime que la maîtrise du danger VTEC, en matière de sécurité sanitaire des aliments, ne peut s'appuyer sur :
 - une recherche par PCR des gènes *stx* dans les aliments qui est, dans l'état actuel des connaissances et des moyens, non pertinente ;
 - une recherche de certains caractères phénotypiques qui s'avère impossible du fait de l'absence de caractéristiques biochimiques communes aux différents sérotypes formant les VTEC.
2. En revanche, l'Agence estime que la recherche spécifique de certains sérogroupes majoritaires, parmi lesquels O157, O111, O26 et O103, pourrait constituer un outil de maîtrise du danger VTEC.
3. L'Agence souligne également que des moyens de recherche devraient être mis en œuvre pour mettre à la disposition des laboratoires de diagnostic des méthodes d'identification des sérogroupes : O111, O26, O103 et O123.

Compte tenu des enjeux en terme d'évaluation et de maîtrise des risques, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a entrepris une réflexion sur les *Escherichia*

¹ Ces différentes fiches sont disponibles sur le site internet de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments : www.afssa.fr (la lecture de ces fiches peut être un préalable utile à la compréhension de ce rapport).

coli VTEC dans le cadre d'un groupe de travail, qui devrait aboutir à un bilan actualisé des connaissances sur ces pathogènes. »

Ce groupe de travail dénommé « *Escherichia coli* vérotoxique » a ainsi été constitué en octobre 2001.

2 Méthodologie

2.1 Groupe de travail

Le groupe de travail, nommé le 17 octobre 2001 et présidé par Madame le Docteur Christine Vernozy-Rozand, comprend des experts du comité d'experts spécialisé (CES) « Microbiologie », et des experts extérieurs à l'Agence. Il est composé de 14 scientifiques (voir liste en page 5).

Les avancées des travaux du groupe ont fait l'objet de plusieurs discussions au sein du comité « Microbiologie » qui a validé le rapport le 14 février 2003. Par ailleurs, ce document a bénéficié d'une relecture critique par le CES Santé Animale, en ce qui concerne les sections B et E, le 12 février 2003.

2.2 Méthodes de travail

Le groupe de travail a procédé à l'analyse des données actualisées de la littérature sur cette thématique. L'ensemble des personnes qui a contribué à l'élaboration et/ou la validation de ce rapport et les personnalités scientifiques qui ont été consultées figurent en début de ce document (voir liste en page 6).

Avec l'accord du CES « Microbiologie », le groupe de travail a préparé une liste de questions dont les réponses constituent le rapport final.

Toute la problématique est donc présentée sous forme de questions structurantes, l'ensemble des questions donnant une articulation logique à la réflexion globale du groupe de travail. Parmi les avantages de cette présentation, on retiendra le fait de pouvoir traiter chaque point individuellement, comme une fin en soi et donc la possibilité d'un travail indépendant sur chaque point ainsi que la possibilité pour le lecteur de ne pas avoir à considérer l'ensemble du travail pour comprendre un point précis.

Cette liste de questions a été validée lors de la première réunion du groupe de travail. Par la suite un regroupement des questions en grandes sections a été effectué.

➤ Remarques

Le groupe de travail souhaite que soient bien pris en compte les points suivants :

- ♦ Le groupe a souhaité limiter, au moins dans un premier temps, son travail à la réponse aux questions sur la base des faits scientifiques, sans interprétation. Il s'agit essentiellement d'un travail bibliographique, conduisant à un état des lieux de la question.
- ♦ Toutefois, le groupe a dû faire des choix dans la masse importante de la littérature publiée. Les connaissances restant du domaine industriel n'ont pu être intégrées.
- ♦ Le groupe de travail a cependant ouvert des pistes de réflexion et proposé des axes de recherche. Il a considéré qu'aller au-delà nécessitait une réflexion ciblée pour laquelle il n'était pas, dans sa configuration actuelle, totalement adapté.
- ♦ Il ne s'agit donc pas d'un travail sur l'estimation qualitative ou quantitative du risque sanitaire, même si les données explicitées sont toutes individuellement utilisables à cet effet. Le rapport ne reprend pas, en particulier, le schéma proposé dans ce but par le *Codex Alimentarius*. Ce projet pourrait d'ailleurs justifier la prolongation des travaux du groupe dans une configuration plus adaptée à cet objectif.
- ♦ Ce travail a permis d'identifier les facteurs de risque sans pour autant les hiérarchiser sur les bases scientifiques disponibles.
- ♦ La rédaction de « points à retenir » en début de section permettra aux lecteurs d'accéder rapidement à l'essentiel des informations contenues dans chaque section.

Le document répond aux questions posées, vise à être informatif, rigoureux (contrôlable) et à s'ouvrir vers l'aspect quantitatif (même limité).

2.3 Bilan et perspectives

Ce rapport est un document scientifique qui constitue une source d'informations pour les scientifiques, les industriels et le public. Même s'il apparaît constituer une base documentaire importante sur les *E. coli* vérotoxiques, cette connaissance ne doit pas être considérée comme exhaustive, le groupe de travail ayant dû faire des choix dans l'abondante littérature existante. Par ailleurs quelques observations n'ont pas fait l'objet de publication et reste du domaine de la connaissance industrielle et de celle des laboratoires.

Les pistes de réflexion et les axes de recherche sont aisés à envisager à la lecture de ce rapport et ont été listés en fin de chaque section.

Parmi ces points, trois axes ont été considérés comme majeurs par le groupe de travail :

1. Améliorer les connaissances et la prévention des infections à STEC chez l'homme en France avec notamment une information du corps médical sur ce danger et une sensibilisation aux diagnostic STEC chez des patients présentant des diarrhées sanglantes.
2. Disposer d'une méthode, harmonisée au niveau national, de détection des STEC dans l'aliment et dans l'environnement.
3. Démarrer une approche d'analyse quantitative du risque lié aux STEC dans certaines familles d'aliments. Cette approche pourrait commencer par l'analyse des travaux existant à l'échelon international permettra d'établir un bilan précis des données manquantes.

Ces deux derniers points feront l'objet des travaux ultérieurs du groupe de travail STEC, émanant du CES « Microbiologie », placé auprès de l'Afssa.

Section A : Historique et Définition des STEC

Responsable de section : C. Vernozy-Rozand

Rédacteurs : E. Espié - C. Vernozy-Rozand

POINTS A RETENIR

- La dénomination STEC (Shiga-toxin-Producing *Escherichia coli*) regroupe toutes les souches de *E. coli* possédant les gènes *stx* codant une toxine particulière, appelée Shiga-like toxine ou vérotoxine ;
- Les STEC sont qualifiés de pathogènes émergents, néanmoins, tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme ;
- La dénomination EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques) concerne les STEC pathogènes pour l'homme ;
- Les STEC ont été impliqués dans de nombreuses épidémies alimentaires ;
- Les signes cliniques associés sont une diarrhée sanglante, un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez les enfants et un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique (PTT) chez les adultes ;
- En France, une centaine de cas de SHU majoritairement liés à des STEC, est recensé par an, chez les enfants de moins de 15 ans, depuis 1995. Les chiffres pour les adultes sont inconnus.

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales. A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournissant une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive, notamment les salmonelles. En outre certaines souches pathogènes de *Escherichia coli* sont connues des médecins comme des agents responsables de gastro-entérite infantile ou de la fameuse "diarrhée du voyageur", souvent d'origine hydrique. Les principaux pathotypes intestinaux, décrits en fonction des signes cliniques engendrés et des facteurs de pathogénicité exprimés, sont : les *Escherichia coli* entérotoxinogènes (ETEC), les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC), les *Escherichia coli* entéroagrégatifs (EAgg), les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC).

En 1982 aux Etats-Unis (dans l'Oregon puis trois mois plus tard dans le Michigan), deux épidémies de colites hémorragiques sévères, nécessitant une hospitalisation de 70 % des malades, apparurent après la consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide. Les analyses mises en œuvre, d'une part sur les selles des patients et d'autre part sur de la viande de bœuf hachée congelée d'un même lot dont provenaient les hamburgers incriminés, mirent en évidence une souche de *Escherichia coli* d'un sérotype particulier O157:H7. Peu de temps après, une étude menée sur les selles d'enfants atteints par un syndrome hémolytique et urémique (SHU) montra la présence d'une toxine, cytotoxique pour les cultures cellulaires Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique), d'où son nom de "vérotoxine", dénommée également « Shiga-toxine » du fait de sa grande similitude avec une toxine produite par *Shigella dysenteriae* (Karmali *et al.*, 1983; Konowalchuk *et al.*, 1977).

Escherichia coli O157:H7 est le principal sérotype de *E. coli* responsable de pathologie chez l'homme. Les souches dites STEC (Shiga-toxin-Producing *E. coli*) sont toutes les souches de *Escherichia coli* ayant les gènes *stx* codant les Shiga-like toxines ou vérotoxines. La dénomination VTEC (verotoxin-producing *E. coli*) a été couramment utilisée jusqu'alors ; aujourd'hui, la convention internationale de

dénomination de ces pathogènes recommande le terme STEC. Les souches isolées chez les malades sont appelées EHEC.

Depuis 1982, de nombreux autres cas d'infections humaines consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des STEC ont été rapportés à travers le monde. Notamment, des épidémies importantes sont survenues : à Washington en 1993 (501 malades, 45 SHU et 3 décès) liée à la consommation de hamburgers, en Ecosse en 1996 (512 malades dont 17 décès) due à la consommation de viande de bœuf et au Japon en 1996 (9451 malades et 12 décès) due à la consommation de radis blanc (voir Section D-Tableau 2 et Tableau 3). Ces épidémies majeures étant toutes dues à *E. coli* O157:H7, les chercheurs ont principalement ciblé leurs travaux sur ce seul sérotype, d'où la pauvreté des informations disponibles sur d'autres sérotypes pourtant importants si on considère leur implication dans des SHU à l'échelon international (O26, O111, O103 et O145).

Il est habituel de qualifier ces pathogènes d'émergents alors même que *Escherichia coli* a été une des premières espèces bactériennes étudiées. L'émergence des STEC est à associer à la double circonstance suivante : la description des SHU est assez récente (1950) de même que celle des épidémies liées à *E. coli* O157:H7 (1980). Les habitudes alimentaires de nos concitoyens ont évolué vers une augmentation du nombre de repas pris hors foyer, notamment des habitudes alimentaires nouvelles (moins de cuisson de certains aliments par exemple) et constituent certainement une circonstance favorable à l'explosion des cas d'infections humaines liées aux STEC.

En France, la surveillance des infections à STEC est basée sur la surveillance des Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU) chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Cette surveillance permet de connaître les caractéristiques épidémiologiques de la maladie, de suivre ses tendances évolutives et de détecter des phénomènes épidémiques. En 2001, le taux d'incidence du SHU était de 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). Cette incidence demeure globalement stable depuis 1993. Récemment, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été détectées et ont fait l'objet d'investigations : une première en décembre 2000, liée à *E. coli* O157 (Haeghebaert *et al.*, 2002a) (10 cas) et une seconde en juin 2002, liée à *E. coli* O148:H8, incriminant de la viande de mouton (Espié *et al.*, 2003) (voir Section D-Question n°18).

Section B : Pathologie Humaine et Animale liée aux STEC

Responsable de section : P. Mariani-Kurkdjian

Rédacteurs : J. Bouvet - V. Livrelli - P. Mariani-Kurkdjian - E. Oswald

Personnalités consultées : C. Loirat

POINTS A RETENIR

- L'ingestion de STEC (aliments contaminés ou ingestion accidentelle) peut se traduire par une diarrhée évoluant dans 90 % des cas en diarrhée sanglante, se compliquant, chez 10 % des sujets, d'un SHU. Le SHU, principale cause d'insuffisance rénale du nourrisson, est responsable de séquelles rénales graves dans un tiers des cas. Il peut entraîner la mort dans moins de 5 % des cas ;
- Les différentes manifestations cliniques sont liées à l'atteinte de l'endothélium vasculaire (rein, intestin, système nerveux central...);
- Les personnes les plus sensibles sont les enfants de moins de 3 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans ;
- Le traitement est symptomatique, l'utilisation des antibiotiques est très controversée ;
- Chez les animaux, seul le porc peut développer une pathologie liée aux STEC (la maladie de l'œdème du porc) ;
- Les animaux, tout comme l'homme, peuvent être porteurs sains de STEC.

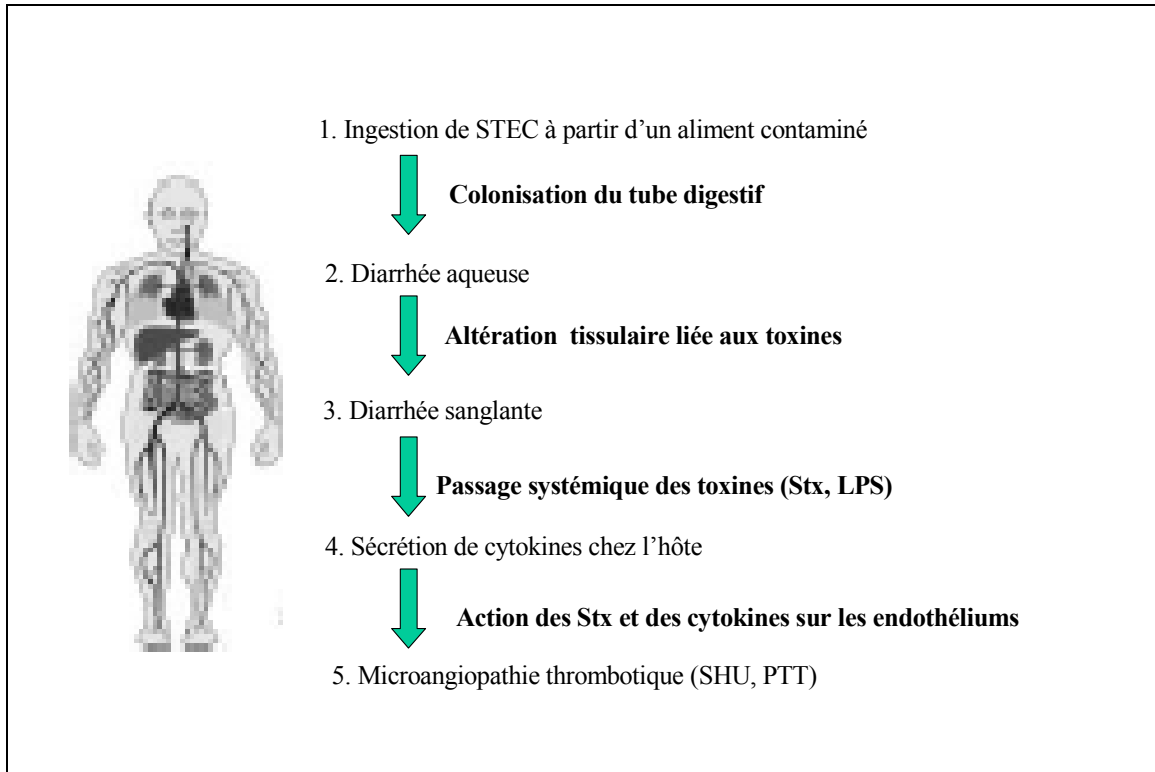
QUESTION N°1 : QUELLES SONT LES DIFFERENTES PATHOLOGIES HUMAINES A STEC ?

L'infection à STEC peut revêtir plusieurs aspects dont le plus fréquent est la colite hémorragique. Le tableau clinique peut cependant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou d'un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Griffin and Tauxe, 1991; Tarr, 1995). Ces différentes entités cliniques seront présentées successivement sous l'angle symptomatologique, diagnostique, et thérapeutique.

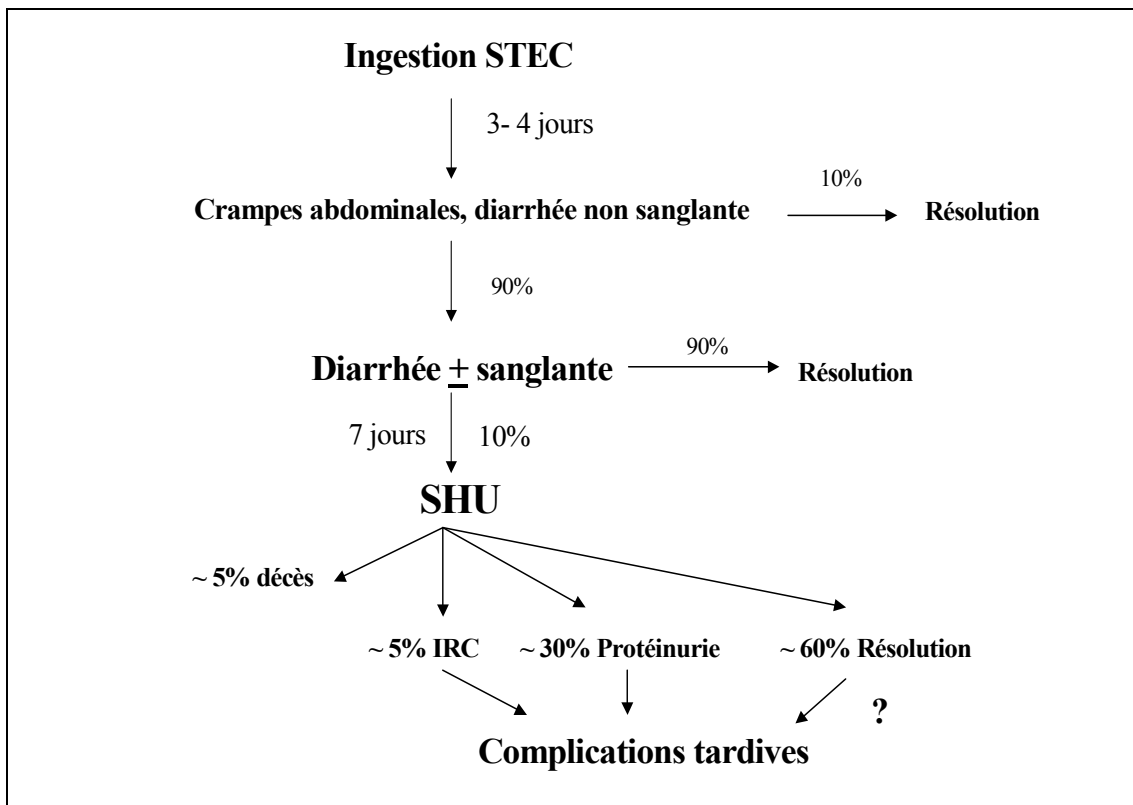
Le SHU et le PTT sont considérés comme un ensemble de manifestations de microangiopathie thrombotique. Ces affections ont en commun des lésions des cellules endothéliales de la microcirculation, suivies d'un gonflement cellulaire, d'adhérence plaquettaire et de thrombose. Les manifestations sont déterminées par le lit vasculaire le plus atteint : celui des reins dans le SHU, celui du cerveau dans le PTT. Ces deux affections sont caractérisées par une microangiopathie sévère, ainsi que par une réduction marquée du taux des plaquettes et du taux d'hémoglobine.

Les évolutions cliniques après ingestion de STEC sont indiquées dans la Figure 1.

Le diagnostic microbiologique des infections à STEC est difficile, en particulier au moment du SHU où la diarrhée peut être absente et il est alors nécessaire de pratiquer un écouvillonnage rectal. Le diagnostic repose d'une part sur la mise en évidence dans les selles ou dans l'écouvillonnage rectal de STEC et/ou des gènes de virulence et d'autre part sur l'augmentation du titre sérique des anticorps anti-lipopolysaccharide.



(Andreoli *et al.*, 2002)



(Heuvelink, 2000)

Figure 1 : Evolutions cliniques après ingestion de STEC

1 Colite hémorragique

Principale manifestation clinique de l'infection à *Escherichia coli* O157:H7 (Griffin and Tauxe, 1991; Tarr, 1995), la colite hémorragique est caractérisée 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 retrouvée 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 (Griffin and Tauxe, 1991; Sharp *et al.*, 1994). L'évolution est généralement spontanément favorable en quelques jours. Des nausées, des vomissements, des céphalées et des frissons ont également été rapportés, mais leur fréquence est plus faible.

Les examens complémentaires sont normaux bien qu'une hyperleucocytose ait été rapportée (Su and Brandt, 1995). Cependant, chez certains patients, on peut observer des signes de destruction érythrocytaire intravasculaire, des signes de thrombopénie (plaquettes < 150 000/μL) et de néphropathie (protéinurie, hématurie et leucocyturie).

L'examen radiologique montre parfois des images de distension du côlon ascendant et du caecum (Su and Brandt, 1995). Dans certains cas, on peut observer des images d'œdème sous muqueux dans le côlon ascendant et transverse (MacDonald *et al.*, 1988). Des saignements à l'intérieur du côlon droit parfois étendus au côlon transverse peuvent être mis en évidence par scintigraphie.

Les principales modifications observées sont des œdèmes, des ulcérations superficielles, des exsudats de fibrine et des hémorragies au sein de la sous muqueuse. Les lésions multifocales sont le plus fréquemment retrouvées au niveau du caecum et du côlon ascendant (Griffin *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 1990). Des lésions similaires à celles décrites dans les colites ischémiques (nécrose de coagulation et inflammation aiguë de la muqueuse avec préservation des cryptes) ou proches de celles décrites dans les colites infectieuses (infiltration de la *lamina propria* et des cryptes par des neutrophiles) ou bien des lésions identiques à celles trouvées lors de colites pseudomembraneuses à *Clostridium difficile* ont également été décrites (Kelly *et al.*, 1990).

Le taux d'hospitalisation au cours de la colite hémorragique varie de 3 à 82 % (Keene *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1988; Sharp *et al.*, 1994; Waters *et al.*, 1994).

Il n'existe pas de traitement spécifique. Le traitement est symptomatique (Su and Brandt, 1995).

Les STEC ne représentent pas les seuls micro-organismes potentiellement responsables de diarrhées sanglantes. Des bactéries telles que *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Clostridium difficile*, certains virus et certains parasites (amibes) peuvent également être incriminés dans l'étiologie des diarrhées sanglantes.

2 Syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Décrit pour la première fois en 1955 par Gasser, le SHU typique touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient brutalement après une diarrhée prodromique sanglante dans la majorité des cas. Ce n'est qu'en 1983 que Karmali *et al.* 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. Deux à 7 % des patients atteints d'une infection intestinale à *E. coli* O157:H7 développeront un SHU. Cette incidence est supérieure chez l'enfant et les personnes âgées : 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin and Tauxe, 1991).

Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Il survient surtout l'été. Son début est brutal. Le pronostic rénal est favorable dans environ les 2/3 des cas (Loirat *et al.*, 1992). Il correspond à des lésions de microangiopathie thrombotique glomérulaire ou de nécrose corticale. Il est caractérisé par une triade de symptômes associant une anémie hémolytique avec schizocytose, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë (Fong *et al.*, 1982).

2.1 Aspects cliniques

Dans la plupart des cas, le tableau de SHU typique post-diarrhée est caractéristique et ne pose pas de problème de diagnostic (Loirat, 2001).

Après une phase prodromique caractérisée par un tableau de gastro-entérite aiguë souvent fébrile, avec des douleurs abdominales, des vomissements, de la diarrhée souvent sanglante, durant 1 à 15 jours, le début du SHU est brutal, caractérisé par l'association typique d'une anémie hémolytique (taux d'hémoglobine inférieur à 80 g/L) avec des schizocytes (le plus souvent 2 à 10 %), d'une thrombopénie, le plus souvent autour de 40 à 50 000/mm³ et d'une insuffisance rénale aiguë avec des taux élevés d'urée et de créatinine sanguine. Environ la moitié des enfants sont anuriques. Si la diurèse est conservée, une hématurie microscopique et une protéinurie sont constantes les premiers jours. Le diagnostic d'anurie pouvant être retardé chez des nourrissons atteints de diarrhée, une hyponatrémie et une hypervolémie avec hypertension artérielle sont souvent présentes à l'admission quand les apports d'eau ont été maintenus pour prévenir la déshydratation liée à la diarrhée. La kaliémie, qui peut être basse initialement en raison de la diarrhée, augmente rapidement, de même que les taux sanguins de phosphore et d'acide urique. Les taux sanguins de calcium et de bicarbonates sont souvent bas. Une polynucléose est fréquente.

Une atteinte d'autres organes que le rein est possible (Loirat *et al.*, 1992; Siegler, 1994) :

- Une colite hémorragique sévère est observée dans 10 à 20 % des cas, avec un méléna prolongé, des douleurs abdominales, des vomissements, un état subocclusif ou un prolapsus rectal. Plus rarement une invagination, une nécrose avec perforation de la paroi colique et sténose secondaire peuvent survenir. L'intestin grêle peut également être touché.
- Une pancréatite aiguë est observée dans environ 20 % des cas, avec des taux sériques d'amylase et de lipase élevés. Une pancréatite nécrosante et un diabète sucré insulino-dépendant, transitoire ou permanent, sont plus rares.
- Une atteinte du système nerveux central est observée dans environ 20 % des cas et peut conditionner le pronostic vital. Les symptômes les plus fréquents sont des convulsions focales ou généralisées, une torpeur voire un coma. Une hémiparésie, une cécité corticale ou au maximum une atteinte du tronc cérébral et une décérébration peuvent survenir. Ces complications sont liées soit à de l'œdème, soit à des microthrombi vasculaires avec infarctus cérébral. Les scanners cérébraux peuvent être normaux initialement, ou montrer des zones hypodenses. L'imagerie par Résonance Magnétique est souvent plus sensible pour détecter des lésions cérébrales. L'atteinte du système nerveux central est actuellement la principale cause de décès. Dans une enquête française, 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 sont décédés (1,4 %), tous d'une atteinte du système nerveux central (Decludt *et al.*, 2000). Beaucoup d'enfants récupèrent sans séquelle, certains gardent des séquelles neurologiques.
- Une atteinte hépatique, le plus souvent bénigne, est observée dans environ 40 % des cas ; elle est simplement marquée par une hépatomégalie et une élévation des transaminases. Une obstruction biliaire liée à l'hémolyse peut survenir. Une obstruction biliaire liée à l'hémolyse peut survenir.
- Une atteinte cardiaque (observée dans moins de 1 % des cas) avec myocardite, choc cardiogénique, cardiomyopathie, ou une atteinte pulmonaire (observée dans moins de 1 % des cas).

2.2 Anato-pathologie

La lésion rénale la plus fréquente est la microangiopathie thrombotique glomérulaire (MAT) (Loirat *et al.*, 1992) caractérisée par un épaississement des parois des capillaires glomérulaires, avec un aspect en double contour dû à l'élargissement de l'espace sous endothélial, associé à un aspect fibrillaire de la matrice mésangiale. Des modifications des artéioles préglomérulaires, caractérisées par un élargissement de l'espace sous endothélial, sont associées aux lésions glomérulaires. Le pourcentage de glomérules porteurs de lésions de MAT est variable, le plus souvent inférieur à 50 %. Les glomérules lésés évoluent vers la sclérose.

Le deuxième type de lésion rénale est la nécrose corticale, plus ou moins étendue.

Dans les formes les plus sévères, les lésions des endothéliums vasculaires ne sont pas limitées aux reins, et touchent d'autres organes tels que le système nerveux central et le pancréas.

2.3 Conduite à tenir

La mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet que le taux de mortalité actuel demeure inférieur à 5 %. Les signes qui doivent faire penser au diagnostic de SHU chez un enfant ayant une diarrhée sont l'apparition d'une somnolence, d'une irritabilité, d'une pâleur, éventuellement avec un ictère discret dû à l'hémolyse, parfois des pétéchies dues à la thrombopénie, une diminution du volume d'urine, et l'apparition d'oedèmes. Il faut alors prescrire une Numération Formule Sanguine avec recherche de schizocytes et compte des plaquettes, un dosage de créatininémie et un ionogramme sanguin. Si l'enfant est oligurique ou anurique, il doit être transféré dans une unité où la prise en charge d'enfants atteints d'insuffisance rénale aiguë et la réalisation d'une épuration extra-rénale sont routinières (Loirat, 2001).

2.4 Traitement symptomatique

Les apports hydro-électrolytiques sont calculés de manière à éviter une déshydratation si l'enfant a encore de la diarrhée et des vomissements, et la surhydratation s'il est anurique. Les apports nutritionnels et hydro-électrolytiques sont apportés par voie orale, éventuellement par voie entérale à débit constant avec une sonde gastrique. Les apports caloriques et protidiques doivent correspondre à 100 % des quantités recommandées. Si des vomissements, de la diarrhée et des symptômes de colite persistent, une nutrition parentérale est nécessaire. Si l'enfant est anurique, une dialyse est indiquée, pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volémique.

La plupart des enfants oliguriques ou anuriques devront être dialysés par une technique de dialyse péritonéale. Une hémodialyse ou une hémodiafiltration sont indiquées si une distension intestinale ou une chirurgie abdominale récente contre-indiquent la dialyse péritonéale.

Des culots globulaires filtrés doivent être transfusés si le taux d'hémoglobine est inférieur à 60-70 g/L. Les transfusions plaquettaires ne sont indiquées, que si le taux de plaquettes est en dessous de 10 000 – 20 000/mm³ avec des saignements ou si un geste chirurgical est nécessaire.

Il n'y a pas de traitement spécifique de la colite, en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale aussi longtemps que nécessaire. La chirurgie peut être indiquée en cas de perforation, d'ischémie sévère ou de sténose secondaire de l'intestin. En cas de diabète, un traitement insulinique est indiqué. Une pancréatite nécrosante sera traitée par les mesures adéquates (aspiration gastrique, somatostatine, agent anti-H₂, nutrition parentérale). Des convulsions sont traitées par le diazepam intra-rectal ou intra-veineux, suivi si nécessaire par du phénobarbital intramusculaire ou de la phénytoïne intraveineuse. En cas d'état de mal convulsif, une perfusion continue de phénobarbital et une ventilation artificielle sont nécessaires.

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. L'héparine, les agents thrombolytiques et les perfusions de plasma frais congelé n'apportent pas de bénéfice significatif. Les échanges plasmatiques ne paraissent pas efficaces, bien qu'ils soient généralement tentés chez les patients qui ont une atteinte du système nerveux central.

2.5 Pronostic

Le taux de mortalité à la phase aiguë est actuellement inférieur à 5 % (Decludt *et al.*, 2000; Repetto, 1997). Le pronostic vital est en cause dans les cas présentant une atteinte multiviscérale incluant le système nerveux central. Cinq à 10 % des enfants évoluent vers une insuffisance rénale terminale, rarement d'emblée, plus souvent après avoir retrouvé une certaine fonction rénale avec une insuffisance rénale chronique pendant quelques années. Après 5 à 10 ans de recul, 40 à 65 % des enfants n'ont pas de séquelles rénales évidentes (pas de protéinurie, pas d'hypertension, taux de créatinine sanguine normal). Néanmoins, après 15 années ou plus de recul, 20 à 40 % des patients ont une protéinurie et/ou une hypertension artérielle, jusqu'à 20 % des patients ayant une insuffisance rénale chronique ou terminale. Ces problèmes peuvent apparaître après plusieurs années de guérison apparente (Gagnadoux *et al.*, 1996; Huseman *et al.*, 1999; Repetto, 1997). Il n'y a jamais de récurrence du SHU typique après transplantation rénale.

A la phase aiguë, les éléments de mauvais pronostic rénal sont l'existence d'une atteinte colique sévère avec prolapsus rectal, d'une atteinte sévère du système nerveux central et d'une polynucléose neutrophile supérieure à 20 000/mm³. Tout se passe comme si la sévérité de l'atteinte de la

microvascularisation au niveau intestinal et au niveau du système nerveux central reflétait la sévérité de l'atteinte de la microvascularisation au niveau rénal (Repetto, 1997). Par ailleurs, des travaux récents indiquent que le transport des Stx entre l'intestin et les organes cibles, c'est-à-dire les endothéliums de la microvascularisation rénale, est assurée par les polynucléaires neutrophiles (Maroeska *et al.*, 2000), ce qui, a priori, est en rapport avec la signification pronostique défavorable de la polynucléose initiale.

Le pronostic rénal à long terme des SHU typiques de l'enfant est d'autant plus réservé que la durée d'anurie initiale a été plus importante (Gagnadoux *et al.*, 1996; Huseman *et al.*, 1999; Loirat *et al.*, 1992; Repetto, 1997). Il avait été montré que les anuries de plus de 8 jours étaient associées à un risque important d'insuffisance rénale séquellaire à moyen et à long terme. Les biopsies rénales faites à l'époque avaient montré que ces cas correspondaient le plus souvent à des lésions de nécrose corticale ou à des lésions de microangiopathie thrombotique glomérulaire touchant plus de 50 % des glomérules. On sait aussi que la persistance d'une protéinurie ou d'une micro-albuminurie excessive à distance de la phase aiguë est un élément de mauvais pronostic. Actuellement, les biopsies rénales à visée pronostique ne sont plus pratiquées, les données citées ci-dessus permettant de bien cerner le pronostic.

Sur le plan pratique, il est conseillé de maintenir une surveillance (tension artérielle, protéinurie, micro-albuminurie, créatininémie une fois par an) à très long terme lorsqu'une anurie d'une semaine ou plus est survenue, puisqu'il est établi que ces patients peuvent avoir des lésions histologiques importantes. Ce type de surveillance est en revanche inutile chez les patients n'ayant jamais présenté d'anurie ou lorsque celle-ci n'a duré que quelques jours, suivie d'une récupération rapide d'une filtration glomérulaire normale sans hypertension artérielle, ni protéinurie, ni micro-albuminurie pendant les 3 à 5 années suivantes.

3 Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT)

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (Moschcowitz, 1925). Comme pour le SHU, 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).

Le PTT touche surtout l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. La diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993).

3.1 Manifestations cliniques

L'hémolyse est une manifestation caractéristique de cette maladie. L'anémie s'associe à une schizocytose, à une érythroblastose circulante, à une hyperréticulocytose et à une thrombopénie d'intensité variable. Un ictère discret peut être observé, et il peut y avoir des pétéchies, mais généralement à un degré moindre que dans le purpura thrombotique idiopathique (PTI). Les tests de coagulation sont habituellement normaux ou très peu perturbés. La recherche d'anticorps antinucléaires est positive dans 20 % des cas. Des hémorragies utérines, gastro-intestinales ou autres surviennent chez quelques malades, mais les saignements graves sont rares.

Beaucoup de malades sont fébriles et beaucoup ont des symptômes non spécifiques comme des nausées, des douleurs abdominales ou des arthralgies. La rate et le foie ne sont habituellement pas palpables.

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. Il s'agit initialement de modifications du comportement avec confusion, délire et troubles de conscience. Les signes d'atteinte focale associent crises d'épilepsie, hémiparésie, aphasie et anomalies du champ visuel. Ces symptômes neurologiques peuvent fluctuer et se terminer en coma. L'atteinte des vaisseaux myocardiques peut être à l'origine de mort subite chez certains malades.

3.2 Pathogénie

Les manifestations peuvent être expliquées par des thrombi plaquettaires et des dépôts de fibrine localisés. Les artérioles sont remplies de matériel hyalin, vraisemblablement composé de plaquettes et de fibrine. Ce même matériel peut être retrouvé au niveau sous-endothélial de vaisseaux par ailleurs indemnes. Des études en immunofluorescence ont montré l'existence d'immunoglobulines et de complément au niveau des artérioles. Celles-ci sont souvent le siège de microanévrismes. De nombreuses controverses existent quant à la spécificité de ces anomalies, certains auteurs les retrouvant dans le syndrome hémolytique et urémique (plus particulièrement au niveau du rein) et dans la coagulation intravasculaire disséminée. La plupart des cas de PTT de l'adulte sont associés à un déficit en protéase du facteur von Willebrand (vwF) dû à la présence d'anticorps anti-protéase du vwF. Ce déficit explique la présence dans le plasma de multimères de très haut poids moléculaire du vwF à l'origine d'une thrombopénie due à une hyper agrégation plaquettaire.

3.3 Diagnostic

L'association anémie hémolytique avec schizocytes, thrombopénie, fièvre, troubles neurologiques et atteinte de la fonction rénale est pratiquement pathognomonique du PTT.

3.4 Traitement et pronostic

Jusqu'à une époque récente, la maladie était presque toujours fatale. Un très grand nombre de modalités thérapeutiques ont été proposées avec des résultats variables. Le traitement du PTT aigu a changé radicalement ces dernières années. Les corticoïdes et l'héparine ou la splénectomie en urgence ont été abandonnés et l'enthousiasme pour les traitements antiplaquettaires a diminué. Le traitement s'est de plus en plus focalisé sur l'utilisation d'exsanguinotransfusions ou de plasmaphèreses répétées associées à la perfusion de plasma frais congelé. Avec cette approche thérapeutique, la mortalité globale a nettement diminué, l'évolution est favorable dans plus de la moitié des cas. La plupart des malades qui passent le cap de la phase aiguë guérissent complètement sans séquelle rénale ou neurologique. Quelques malades présentent une forme chronique, récidivante et nécessitent un traitement d'entretien par plasmaphèreses et perfusions de plasma. De rares malades sont contrôlés uniquement par les corticoïdes.

4 Nouveaux aspects cliniques

Récemment, des auteurs ont décrit le développement de SHU au décours d'infections urinaires dues à des souches de STEC (Miedouge *et al.*, 2000; Starr *et al.*, 1998), l'apparition de PTT isolé (Ludwig *et al.*, 1998), de SHU sans diarrhée prodromique associé à des critères d'infection à STEC (c'était le cas chez 9 patients sur 122, soit 7 % dans une enquête française) (Decludt *et al.*, 2000) et dont l'évolution était celle d'un SHU typique sans rechute.

5 Traitements des infections à STEC

Malgré la sensibilité à de nombreuses classes d'antibiotiques de la majorité des souches de *E. coli* O157:H7, l'utilisation d'antibiotiques est encore controversée : en ce qui concerne la durée de la maladie, aucune différence significative n'est retrouvée dans les différentes études entre les patients recevant des antibiotiques et ceux non traités. De plus, l'utilisation des antibiotiques conduit à l'aggravation de l'infection par destruction de la bactérie, induisant des concentrations en toxines libres plus élevées et de ce fait plus disponibles à l'absorption systémique (Cimolai *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994; MacDonald *et al.*, 1988; Tarr, 1995).

Une donnée récente importante est que, chez les sujets ayant une diarrhée à *E. coli* O157:H7, l'administration d'antibiotiques (betalactamines, triméthoprim sulfaméthoxazole ou quinolones) ne prévient pas la survenue du SHU, mais au contraire en augmente significativement le risque, en favorisant la libération des Stx à partir des bactéries (Wong *et al.*, 2000). Cela signifie que l'administration d'antibiotiques est contre-indiquée chez les sujets ayant une diarrhée à *E. coli* O157:H7 et chez les personnes de leur entourage, en particulier lorsque celles-ci ont une diarrhée, ou en cas d'épidémie de diarrhée à *E. coli* O157:H7. Il est également très probable que l'administration de ralentisseurs du transit chez les sujets ayant une diarrhée à *E. coli* O157:H7 augmente le risque de survenue du SHU (Cimolai *et al.*, 1990; Vermeyen *et al.*, 2000).

Cela ne doit pas remettre en cause l'administration d'antibiotiques chez les enfants ayant une diarrhée sanglante avec fièvre. Cette prescription est justifiée par le fait que ces problèmes peuvent être dus à une infection intestinale à Shigelles ou à Salmonelles, avec des hémocultures éventuellement positives. Malheureusement, les techniques actuelles ne permettent pas d'établir suffisamment rapidement ce diagnostic différentiel, mais il est probable que les techniques de diagnostic moléculaire permettront, dans quelques années, une identification en quelques heures.

Idéalement, il faudrait disposer de techniques permettant d'impliquer rapidement la responsabilité d'un *E. coli* O157:H7, ce qui contre-indiquerait l'administration d'antibiotiques.

Des stratégies thérapeutiques nouvelles sont en cours de développement, en particulier le Synsorb Pk®, résine administrée par voie orale, composée de silice porteuse de récepteurs saccharidiques fixant les Stx. Les essais réalisés au Canada et au Japon montrent que l'administration dans les 2 premiers jours suivant le début de la diarrhée diminue le risque de SHU, mais n'empêche pas les formes graves avec atteinte du système nerveux central (Armstrong and Rowe, 1997; Igarashi, 2002).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin disponible bien que de nombreuses approches vaccinales aient été réalisées chez l'animal (Gyles, 1998; Nataro and Kaper, 1998). Deux stratégies vaccinales semblent envisageables :

- une vaccination antitoxine, afin de prévenir les complications systémiques des toxines bien que chez l'animal certains vaccins anti-Stx1 et anti-Stx2 se soient révélés inefficaces (Gyles, 1998; Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998b) ;
- une vaccination permettant de prévenir la colonisation par les EHEC à l'aide de vaccins dirigés contre les facteurs d'adhésion tel que l'intimine, ou contre le LPS de O157 (Nataro and Kaper, 1998; Tauxe, 1998).

QUESTION N°2 : QUELLES SONT LES PATHOLOGIES ANIMALES A STEC ?

Les STEC sont responsables de diarrhées chez le veau (Hall *et al.*, 1985; Moxley and Francis, 1986; Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Wray *et al.*, 1989) mais la production de toxines Stx ne semble pas intervenir dans la pathologie due aux STEC chez les ruminants (Dean-Nystrom *et al.*, 1997). L'absence de récepteur pour les toxines Stx expliquerait que les ruminants ne développent pas de toxémie ou de dommage vasculaire systémique (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000). En fait, peu d'animaux sont naturellement sensibles à une toxémie due à la production de Stx. Seuls les porcs développent une pathologie particulière : la maladie de l'œdème. Les animaux atteints ont des œdèmes, en particulier des paupières, du larynx et du front ; ils titubent, semblent aveugles et, dans les cas les plus avancés, sont couchés sur le côté et présentent des mouvements de pédalage. La mort peut survenir moins de 24 heures après le début des signes cliniques (Martineau, 1997). Cette maladie a été décrite pour la première fois par Shanks en 1938 (Shanks, 1938). Les souches de *E. coli* responsables sont hémolytiques et de sérogroupes O138, O139 et O141. Ces *E. coli* spécifiques du porc produisent Stx2e un variant des toxines qui reconnaît Gb4 comme récepteur glycolipidique à la surface des cellules. Stx2e est responsable des dommages vasculaires et des œdèmes ainsi que des foyers de dégénérescence dans le tronc cérébral (angiopathie cérébrospinale) (Bertschinger and Pohlenz, 1983; Kausche *et al.*, 1992; MacLeod *et al.*, 1991; Smith and Halls, 1968). Comme pour le SHU chez l'homme, la maladie de l'œdème du porc est souvent précédée d'épisodes diarrhéiques mais cette diarrhée est rarement hémorragique et est due à la production d'entérotoxines thermostables : STa ou STb (Bertschinger and Pohlenz, 1983; Smith and Halls, 1968). Les souches de *E. coli* responsables de la maladie de l'œdème ne possèdent pas le LEE qui code pour l'intimine mais colonisent l'intestin grêle à l'aide d'adhésines fibriaires spécifiques : F18 (Imberechts *et al.*, 1997; Vogeli *et al.*, 1996) (voir Section C-Question n°6).

QUESTION N°3 : QUE SAIT-ON DU PORTAGE HUMAIN A STEC ?

Le portage sain, ou asymptomatique, peut se définir par la présence temporaire ou durable d'une bactérie pathogène n'induisant aucune réaction chez l'hôte mais permettant la transmission de la bactérie à un autre hôte. Dans certains cas, ce portage sain ne se traduit pas par un développement de l'agent pathogène chez l'individu, mais par un simple transit.

La fréquence du portage humain est à ce jour difficile à apprécier. En effet, il existe des cas asymptomatiques qui par définition ne pourront être diagnostiqués en raison de l'absence de symptôme. Ce n'est qu'au décours d'enquêtes épidémiologiques dans l'entourage de patients atteints que des souches de STEC ou des anticorps antilipopolsaccharides ont pu être mis en évidence chez les personnes asymptomatiques.

Chez l'homme, *E. coli* O157 peut être retrouvé dans les selles plusieurs semaines après la résolution des symptômes. Les sujets ayant acquis une souche de *E. coli* O157:H7 au contact d'un patient peuvent rester porteurs asymptomatiques pendant plusieurs jours ; ce portage apparaît plus long chez les jeunes enfants que chez les plus âgés et que chez les adultes (Belongia *et al.*, 1993; Griffin and Tauxe, 1991).

En dehors du facteur âge, le portage est différent en fonction de l'environnement. Chez le personnel travaillant dans l'industrie de la viande en Suisse, Stefan *et al.* (2000) ont retrouvé une prévalence de portage de STEC de 3,5 % : une PCR a été réalisée sur 5590 selles d'employés sains 47 souches de STEC ont été isolées dont une seule appartenait au sérotype O157 ; la majorité des souches était Stx2 positives.

Lors d'une étude portant sur des familles vivant dans des fermes produisant du lait, Wilson *et al.* (1998) ont retrouvé la présence de STEC dans les selles de 6,3 % des membres des différentes familles (21 sur 335). Dans l'ensemble, 12 % des membres avaient des anticorps dirigés contre le LPS de *E. coli* O157. Aucune maladie ne s'est déclarée chez les résidents de la ferme, ce qui pourrait témoigner d'une protection induite par les anticorps.

Une étude réalisée à Clermont Ferrand (France) sur 403 enfants hospitalisés ne présentant pas de diarrhée, a permis de mettre en évidence une prévalence de 2,7 % de STEC par une PCR directe sur les selles (Pradel *et al.*, 2000a).

Dans l'entourage de patients atteints de SHU, la prévalence du portage chez les sujets contacts semble beaucoup plus importante comme le montre l'étude de Te Loo, *et al.* (2001) : en analysant la liaison vérotoxines - polynucléaires, les auteurs retrouvent une prévalence de 82 % chez les sujets contacts tandis que l'analyse des selles et/ou du sérum ne retrouve qu'une prévalence de 21 %. Les méthodes classiques sous estiment ainsi le portage chez les sujets contacts de patients atteints de SHU et, outre le portage, les facteurs de sensibilité individuelle de l'hôte semblent jouer un rôle déterminant dans le déclenchement de la maladie (voir Section B-Question n°4).

QUESTION N°4 : EXISTE-T-IL DES FACTEURS DE SENSIBILITE AUX INFECTIONS A STEC ?

L'analyse des grandes épidémies à *E. coli* O157:H7 a permis d'identifier certains facteurs de sensibilité aux infections à STEC. En effet, parmi les personnes exposées au risque lors de ces épidémies, certaines sont asymptomatiques et ne présentent aucun signe clinique, d'autres ne développent que des formes modérées, d'autres enfin présentent des complications sévères, voire mortelles. L'identification des facteurs de sensibilité a un intérêt clinique car elle pourrait permettre une prise en charge spécifique précoce des patients à risque de complications rénales.

Parmi les facteurs de sensibilité identifiés figurent :

- l'âge : les populations les plus à risque de développer des infections et des formes sévères sont les enfants de moins de 15 ans (la distribution des cas de SHU chez l'enfant montre l'incidence la plus élevée chez l'enfant de moins de 3 ans), et les personnes âgées de plus de 65 ans. Lors de l'épidémie de 1996 en Ecosse, le risque de développer des complications (SHU/PTT) était 4 fois plus élevé pour ces catégories, qu'entre 15 et 65 ans (Todd and Dundas, 2001).
- l'immunité : les familles d'éleveurs seraient protégées par une exposition répétée à des STEC (Wilson *et al.*, 1996). Par ailleurs, des souris adultes primo-infectées sont résistantes à une nouvelle colonisation intestinale par O157 : dans ce modèle expérimental, l'absence de colonisation est corrélée à la présence d'immunoglobulines A dirigées contre O157 (Conlan and Perry, 1998).
- les modifications du tractus gastro-intestinal (diminution de l'acidité gastrique, ralentissement du transit, malnutrition) : il a été suggéré que de nombreux enfants atteints d'infection à O157:H7, au Japon, présentaient un régime déséquilibré (Kurioka *et al.*, 1998). Un modèle expérimental murin

a permis de montrer une augmentation très nette de la sensibilité des souris soumises à un régime carencé, pauvre en protéines (75 % d'entre elles meurent, alors que toutes les souris témoins survivent). Ce régime carencé affecte considérablement le développement de l'épithélium intestinal et des cellules immunitaires, et jouerait un rôle sur la flore intestinale (Kurioka *et al.*, 1998).

- le groupe sanguin : certaines études avaient suggéré que les globules rouges puissent véhiculer les toxines Stx jusqu'aux cellules cibles par l'intermédiaire des récepteurs Gb3 (voir Section C-Question n°6-Point 1.3). La composition en Gb3 des érythrocytes de patients ayant développé un SHU a été comparée à des témoins, et a montré une différence au niveau de la longueur des chaînes d'acides gras du récepteur (Jacewicz *et al.*, 2000). Cette différence aurait pu influencer sur l'affinité de la toxine pour le récepteur, donc expliquer une sensibilité différente des patients. Cependant, ce travail n'a pas été confirmé. Plus récemment, une étude concernant 186 patients touchés lors de l'épidémie de 1996 en Ecosse, a permis de mettre en évidence une prédominance du groupe sanguin O parmi les patients (63,4 %) (Blackwell *et al.*, 2002). De plus, une absence de réaction avec l'antisérum anti P est très significativement associée aux formes sévères de la maladie (40,7 % des contrôles, 61,5 % des patients, 83,3 % des patients atteints de SHU). L'hypothèse avancée est que l'antigène P, présent sur les érythrocytes, fixerait la toxine Stx, empêchant celle-ci d'atteindre ses cibles.
- le nombre et la répartition des récepteurs des toxines Stx : les jeunes enfants auraient davantage de récepteurs Gb3 au niveau rénal, ce qui expliquerait la fréquence des complications de type SHU (Ray and Liu, 2001).
- certains paramètres biologiques tels qu'un nombre élevé de neutrophiles ($>15 \times 10^9$ cellules/L), ou une hypoalbuminémie ($< 35\text{g/L}$) sont associés à un risque élevé de développer un SHU (Dundas *et al.*, 2001).
- une période d'incubation courte est également associée à un risque de complications plus important (Todd and Dundas, 2001). Ceci pourrait être lié à la dose de bactéries ingérées : plus la dose est massive, plus l'incubation est courte et plus la forme clinique est grave.
- un traitement antibiotique antérieur à l'infection semble être un facteur de risque de complications (Todd and Dundas, 2001). Ceci suggère un rôle possible de la flore intestinale, mais l'absence d'arguments expérimentaux ne permet pas de confirmer cette hypothèse. D'autre part, les traitements antibiotiques "curatifs" favoriseraient l'évolution vers un SHU (Wong *et al.*, 2000), (voir Section B-Question n°1-Point 5).

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

→ Développement de nouvelles techniques diagnostiques et thérapeutiques : développer une méthode de PCR en temps réel sur les selles avec 3 objectifs :

- Rendu plus rapide des résultats pour la recherche de *E. coli* producteur de vérotoxines permettant au clinicien une décision d'instaurer ou non une antibiothérapie à un enfant atteint d'une diarrhée sanglante fébrile ;
- Une quantification du nombre de gènes de vérotoxine présents dans les selles chez les enfants hospitalisés pour SHU. Ce nombre de gènes pourrait être corrélé à la gravité des symptômes et à l'évolution de la maladie ;
- L'utilisation de certains antibiotiques (fluoroquinolones) jouerait un rôle dans la mobilisation et la multiplication des bactériophages porteurs des gènes de vérotoxines aboutissant à l'infection d'autres *E. coli* et donc à l'extension du nombre de STEC. Cette hypothèse pourra être confirmée par une étude *in vitro* de transfert de gène de souches productrices à des souches initialement non productrices en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique. Une quantification par PCR en temps réel du nombre de gènes rapporté au nombre de bactéries avant et après contact avec l'antibiotique y sera associée.

→ Antibiotiques et infections à STEC : Réalisation d'études *in vitro* sur l'action de différents antibiotiques sur les souches de STEC afin d'évaluer l'impact de la lyse bactérienne à la fois sur la libération des endotoxines (Limulus test) et des vérotoxines (PCR quantitative) et donc d'évaluer les facteurs de risque de développer un SHU en fonction de l'antibiotique utilisé

→ Développement de la mise en évidence du transport des vérotoxines par les polynucléaires neutrophiles directement dans le sang des patients arrivant aux urgences, présentant une diarrhée sanglante.

Section C : Physiopathologie des maladies liées aux STEC

Responsable de section : V. Livrelli

Rédacteurs : G.Grimont - V. Livrelli - P. Mariani-Kurkdjian – N. Pradel – E. Oswald

POINTS A RETENIR

- Les souches STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines : Stx1 et/ou Stx2 ; Stx2 étant une toxine plus puissante que Stx1 ;
- Il existe de nombreux variants du gène codant Stx2 ;
- Ces toxines se fixent sur le récepteur Gb3, présent principalement dans les cellules endothéliales vasculaires, puis détruisent ces cellules expliquant ainsi les manifestations cliniques (complications rénales ou neurologiques) ;
- La plupart des souches pathogènes pour l'homme a la possibilité de provoquer des lésions d'attachement et d'effacement des microvillosités intestinales, dues à l'expression du gène *eae*, entraînant des symptômes diarrhéiques. Cette particularité est partagée par les souches EPEC ;
- Tous les facteurs impliqués dans la pathogénicité de ces souches chez l'homme, ne sont pas encore identifiés ;
- La majorité des facteurs de virulence a été acquise par des mécanismes d'échanges génétiques par transfert horizontal, avec un rôle important des bactériophages.

QUESTION N°5 : QUE SAIT-ON DE LA PHYSIOLOGIE DES INFECTIONS A STEC ?

L'essentiel des signes cliniques est lié à la production des toxines Stx. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel, et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs de l'hôte (Paton and Paton, 1998b). Les étapes essentielles de ce processus sont illustrées dans la Figure 2. Après ingestion, les STEC doivent résister à l'acidité de l'estomac. Une étape de colonisation du tube digestif est probablement nécessaire : la plupart des souches STEC (en particulier celles de sérotype O157:H7) sont capables de produire des lésions d'attachement/effacement ; pour les autres, les mécanismes de colonisation sont encore mal connus. Les toxines produites par les bactéries doivent ensuite traverser l'épithélium intestinal, avant de rejoindre le système circulatoire et atteindre les récepteurs spécifiques localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les toxines Stx entraînent la mort des cellules cible par arrêt des synthèses protéiques. Un rôle des bactéries et/ou des toxines sur l'activation du système immunitaire est également suspecté (Heyderman *et al.*, 2001).

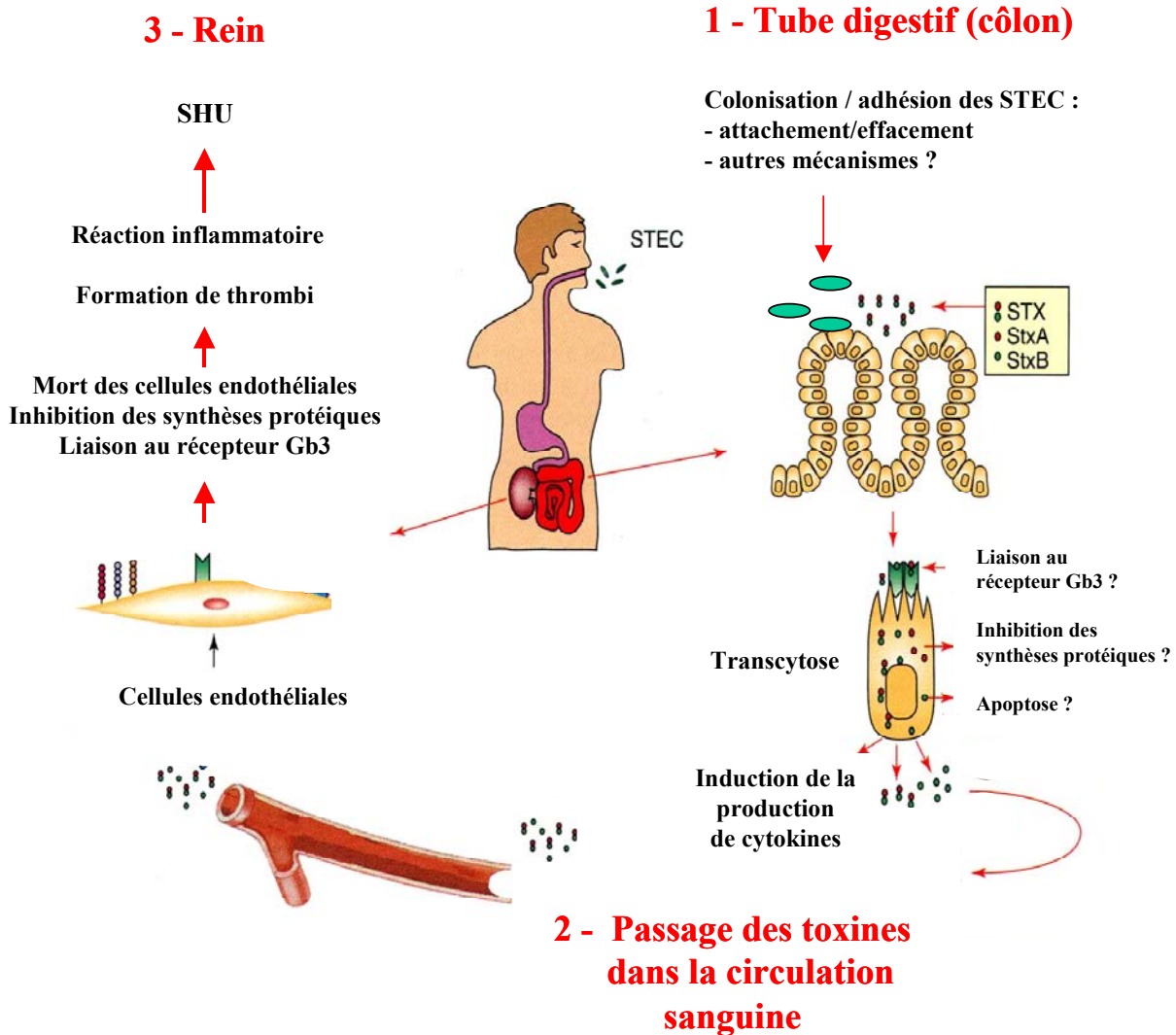


Figure 2 : Principales étapes du processus infectieux des STEC d’après M. Soriani (Heyderman *et al.*, 2001) adapté par V. Livrelli. Après ingestion des STEC, une étape de colonisation du tube digestif est probable. Les toxines traversent l’épithélium intestinal par transcytose, avant de rejoindre le système circulatoire. Elles peuvent alors atteindre les récepteurs spécifiques (Gb3) localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral.

QUESTION N°6 : QUELS SONT LES FACTEURS DE VIRULENCE DES STEC ?

1 Les Shiga-toxines

1.1 Structure des Shiga-toxines

Toutes les souches STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines (Stx). Ces toxines présentent des homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982; Strockbine *et al.*, 1988). Ce sont des hétéropolymères de 70 kDa constitués d'une sous-unité A (pour Activité) de 33-kDa et de 5 sous-unités B (pour Binding ou liaison) de 7,7-kDa. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase sur l'adénosine située en position 2348 de l'ARN ribosomique 28S (Endo *et al.*, 1988). Les deux sous-unités A et B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type λ -like (Figure 3). Cet opéron est constitué de deux cistrons, l'un proximal codant la sous-unité A, l'autre distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B.

1.2 Mécanismes de sécrétion des Shiga-toxines

A l'heure actuelle, on ne connaît pas les mécanismes par lesquels les Stx sont sécrétées. Plusieurs hypothèses sont envisagées : les toxines pourraient être sécrétées par la voie classique car les 2 sous-unités A et B possèdent une séquence-signal. Elles pourraient également être relarguées après lyse de la bactérie suite à l'induction des phages. Enfin, les vésicules membranaires pourraient jouer un rôle dans la sécrétion des toxines (cf infra).

1.3 Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cible

Dans une première étape, il y a fixation à la membrane cytoplasmique de la cellule cible (Figure 3) : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- α (1-4), galactose- β (1-4) glucosyl-céramide) (Lingwood *et al.*, 1987). Une fois la toxine internalisée par un mécanisme classique d'endocytose, elle 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, bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al.*, 1999). Ceci conduit à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort cellulaire. L'effet cytotoxique des Stx peut classiquement être mis en évidence grâce à un modèle *in vitro* sur les cellules de type Vero ou HeLa (Konowalchuk *et al.*, 1977). D'autre part, un effet apoptotique des toxines Stx a été montré sur différents types cellulaires (Jones *et al.*, 2000; Kiyokawa *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1999). Enfin la toxine (et en particulier les sous-unités B) pourrait induire la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales (Hurley *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 1999).

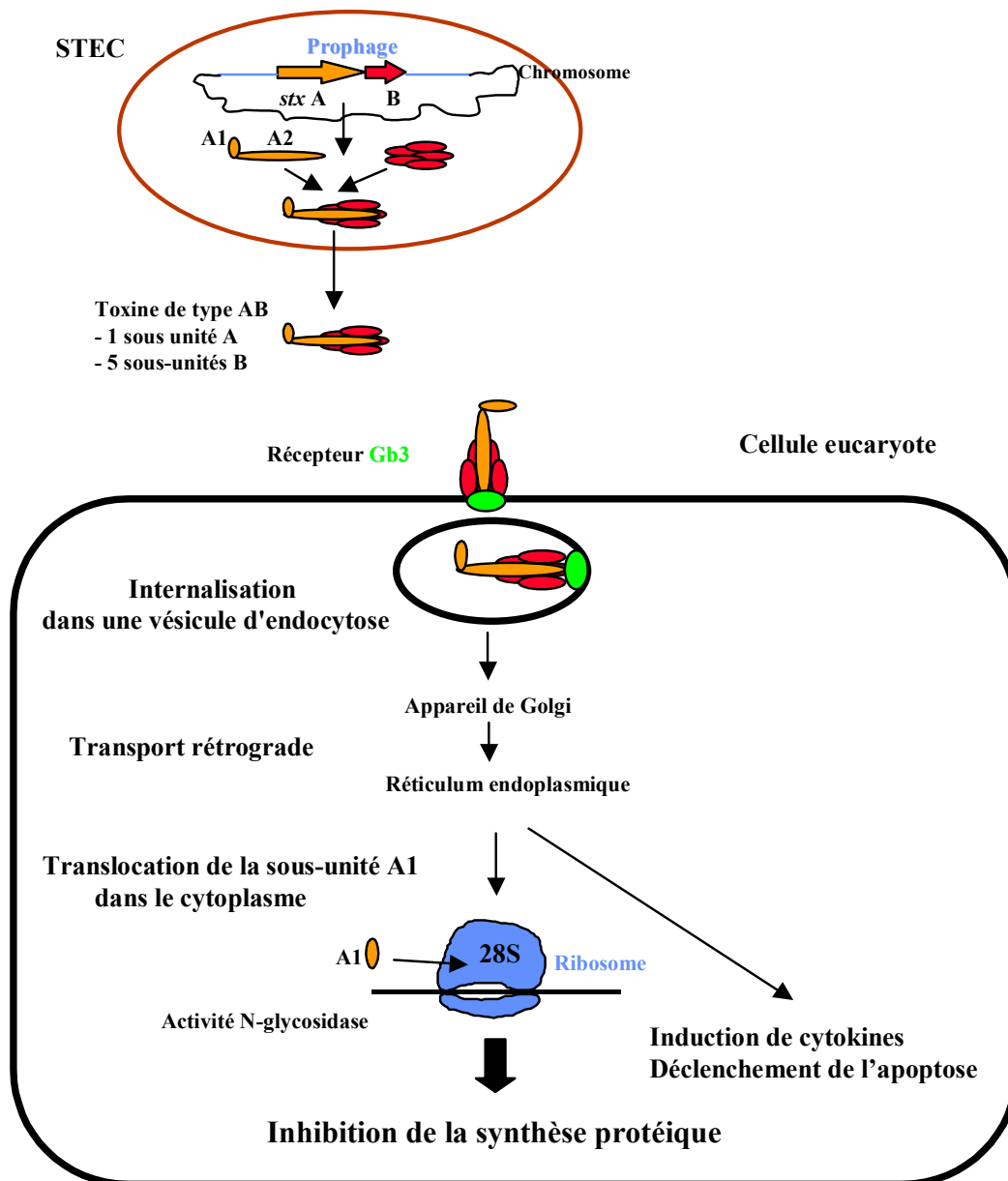


Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de Pradel, 2001). Les STEC possèdent sur leur chromosome des bactériophages portant les gènes *stxA* et *B*. La toxine comporte 1 sous-unité A et 5 sous-unités B. Après fixation de la toxine sur le récepteur Gb3 à la surface des cellules eucaryotes, internalisation, transport rétrograde et translocation, l'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 sur l'ARN 28S entraîne une inhibition totale des synthèse protéiques et donc la mort de la cellule.

1.4 Différents variants de Shiga-toxines identifiés

On considère deux grandes classes de Shiga-toxines : alors que les toxines Stx1 sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, les toxines Stx2 ne le sont pas (Calderwood *et al.*, 1996; Strockbine *et al.*, 1986). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologies au niveau de la séquence en acides aminés avec 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).

Des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales rénales (Louise and Obrig, 1995), et *in vivo* sur des modèles animaux (Lindgren *et al.*, 1993; Wadolowski *et al.*, 1990b) indiquent que Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Ces résultats corroborent les données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des cas les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157:H7, produisent Stx2 (Boerlin *et al.*, 1999). Toutefois, de nombreux STEC non-O157:H7 classiquement impliqués dans les cas de SHU, appartenant aux sérogroupes O26:H11, O103:H2, et O111:H⁻, portent uniquement le gène *stx*₁.

Cinq variants, au moins, sont différenciés dans la classe des toxines Stx2 : Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, et Stx2f. Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs (Calderwood *et al.*, 1996). D'autres variants ont été mis en évidence sur la base de différences au niveau de la séquence nucléotidique des gènes (Bastian *et al.*, 1998; Bertin *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000; Pierard *et al.*, 1998). Certains variants semblent associés à des hôtes spécifiques : Stx2e est retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine, le variant Stx2d semblant associé aux souches d'origine ovine (Cornick *et al.*, 2000b; Ramachandran *et al.*, 2001). Le variant Stx2e, associé à "l'œdème du porc", et rarement trouvé dans les souches d'origine humaine, se lie à un récepteur différent du Gb3, le globotétrasyd céramide Gb4 (DeGrandis *et al.*, 1989). D'autre part, le type de variant Stx pourrait influencer directement la virulence des souches (Friedrich *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 1995). L'activation (clivage protéique) de Stx2d et Stx2c par le mucus intestinal humain et murin a été démontrée (Melton-Celsa *et al.*, 1996).

1.5 Mécanismes de traversée l'épithélium intestinal de Shiga-toxines

Les mécanismes par lesquels les toxines Stx traversent la barrière de l'épithélium intestinal restent mal connus. Les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas franchir cette barrière de la même façon (Hurley *et al.*, 1999) : Stx1 pourrait utiliser un mécanisme de translocation impliquant un récepteur cellulaire différent du Gb3, sans endommager les cellules (Acheson *et al.*, 1996) alors que la transmigration des neutrophiles à travers l'épithélium intestinal permettrait le passage des toxines Stx2 par voie paracellulaire (Hurley *et al.*, 2001).

1.6 Rôle des toxines dans la physiopathologie

Après avoir traversé l'épithélium intestinal, les toxines seraient capables de diffuser par voie systémique, et d'être véhiculées jusqu'aux organes cibles par la circulation sanguine, soit via les globules rouges, soit par l'intermédiaire des polynucléaires. Elles seraient responsables des thromboses observées au cours des atteintes locales et systémiques par altération des cellules endothéliales (Louise and Obrig, 1995). En effet, les cellules endothéliales vasculaires humaines, au niveau colique, 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, 1998b). Une action directe de Stx au niveau des microvillosités des cellules épithéliales intestinales a été suggérée par des études sur des biopsies de côlon humain et sur des côlons 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 colique.

Un rôle synergique de Stx et des cytokines a été mis en évidence (Figure 4) : Stx induirait la production de cytokines par les macrophages et les monocytes (TNF- α , IL-1 β , IL-12...). Les cytokines induiraient alors la production de Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de Stx (Foster *et al.*, 2000; Isogai *et al.*, 1998; Kita *et al.*, 2000; Tatewaki *et al.*, 2000; Tesh, 1998). Plus récemment, l'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC a été mise en évidence (Hurley *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2001). En activant la réponse inflammatoire, cette induction 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.

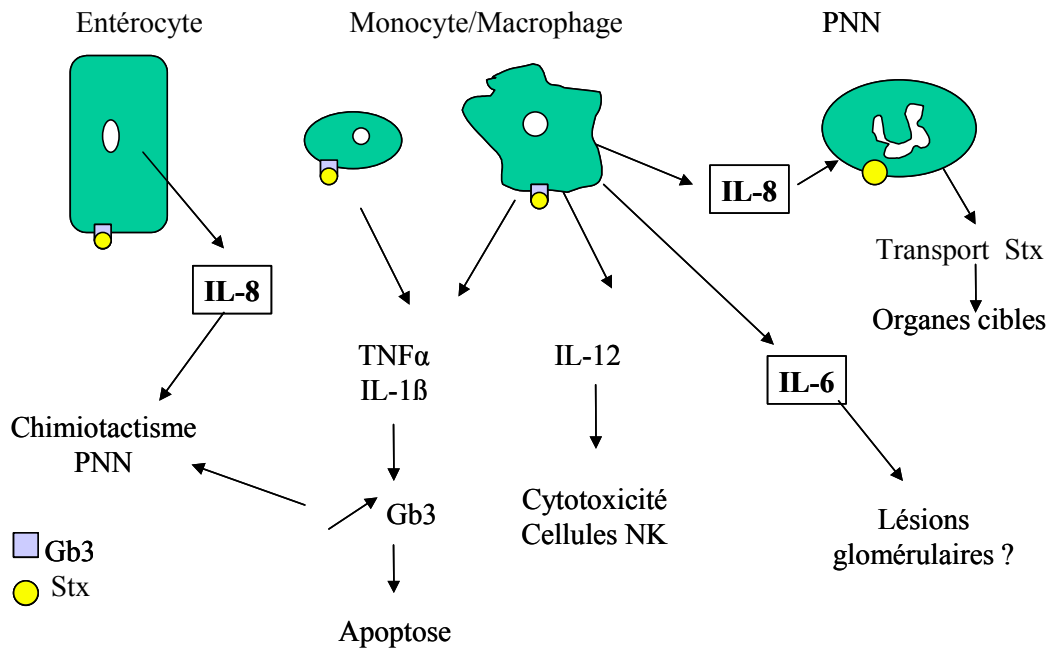


Figure 4 : Rôle synergique des Shiga-toxines et des cytokines (d'après Tatewaki, 2000). Stx induirait la production de cytokines par les macrophages et les monocytes (TNF- α , IL-1 β , IL-12...). Les cytokines induiraient alors la production de Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de Stx. L'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC permettrait le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et ainsi la dissémination systémique des toxines et favoriserait l'évolution vers un SHU.

1.7 Modèles animaux expérimentaux ?

Les différents aspects de la pathologie liée à la production des toxines Stx par les EHEC peuvent être reproduit expérimentalement chez le babouin (Siegler *et al.*, 2001), le lapereau (Pai *et al.*, 1986), le lapin sevré (Richardson *et al.*, 1992; Sjogren *et al.*, 1994), la souris axénique (Isogai *et al.*, 1998), la souris traitée à la streptomycine (Karpman *et al.*, 1997; Kita *et al.*, 2000; Lindgren *et al.*, 1993; Wadolkowski *et al.*, 1990a), et le porcelet axénique (Francis *et al.*, 1989; Tzipori *et al.*, 1986). Ces différentes études ont confirmé le rôle des toxines Stx dans la pathologie des EHEC et ont permis de développer le concept que les lésions tissulaires observées étaient liées au niveau d'expression des récepteurs glycolipidiques des toxines qui agissent en synergie avec la réponse inflammatoire induite par la présence de LPS. Par ailleurs, une activité directe sur les entérocytes a été montrée chez le lapin (Ferreira *et al.*, 1997). Cependant aucun de ces modèles ne reproduit à lui seul l'ensemble de la physiopathologie de l'infection. Récemment le furet a été proposé comme un modèle alternatif (Woods *et al.*, 2002). Néanmoins, il convient de noter que dans la plupart de ces modèles, il est très difficile de reproduire les symptômes de la maladie sans modifier la flore intestinale. Souvent cette étape de colonisation est contournée en injectant directement la toxine par voie intraveineuse.

2 Les facteurs d'adhésion

2.1 Lésions d'attachement-effacement

La colonisation du tube digestif par certaines souches STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum. Les lésions A/E, d'abord décrites chez un autre pathovar de *E. coli* responsable de diarrhées, les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible (Donnenberg and Kaper, 1992; Knutton *et al.*, 1987; Moon *et al.*, 1983). Un piédestal, constitué d'actine cellulaire, sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite, est alors constitué (Figure 5). Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales, en diminuant la surface d'absorption, pourraient entraîner les symptômes diarrhéiques observés lors des infections.

Les lésions A/E peuvent être observées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires, mais sont généralement étudiées sur les cellules Hep-2 et HeLa (Knutton *et al.*, 1989). Ce phénotype est plus difficilement observable pour certaines souches STEC comme O157:H7. Ceci pourrait être dû à des différences au niveau de l'étape initiale d'attachement, à des types différents d'intimines, ou encore à des mécanismes moléculaires différents (absence de phosphorylation de Tir, mécanismes de régulation) (Abe *et al.*, 2002; DeVinney *et al.*, 2001). Le phénotype A/E a été observé sur un modèle IVOC (*in vivo* organ cultures) de l'intestin humain (Frankel *et al.*, 1998; Hicks *et al.*, 1998). Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, il a été montré que l'adhésion des EHEC se limitait à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Hartland *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000). Cette différence avait également été mise en évidence chez les porcelets gnotobiotiques (Donnenberg *et al.*, 1993; Tzipori *et al.*, 1995).

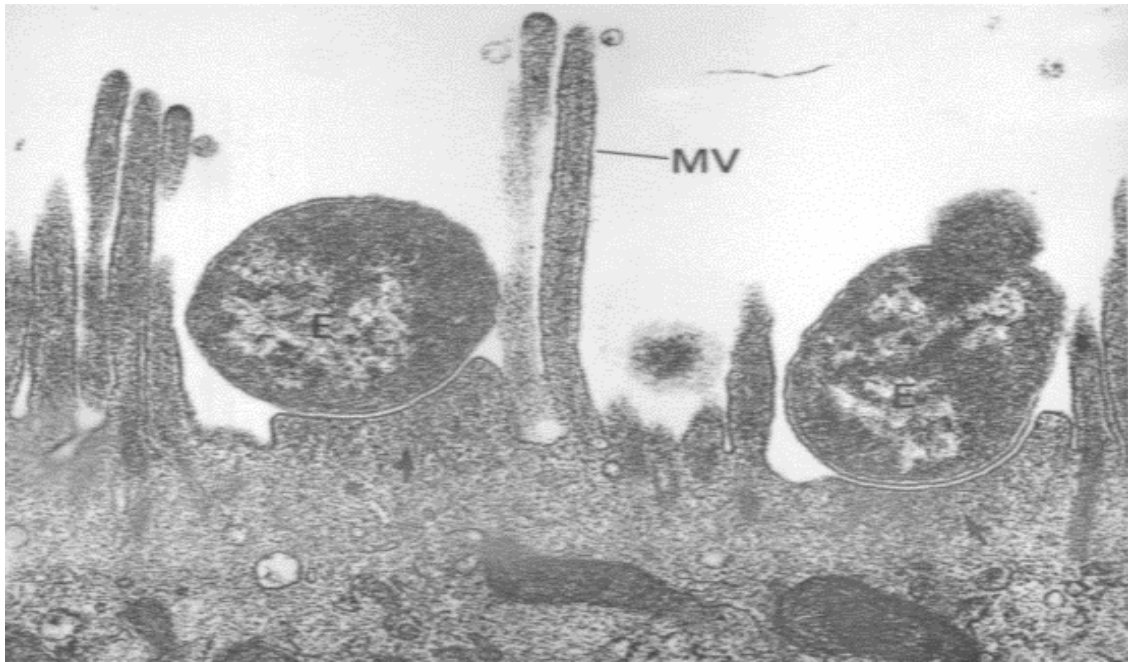


Figure 5 : Les lésions d'attachement effacement (A/E). Observation par microscopie électronique des lésions A/E de la souche EPEC de référence E2348/69 sur des entérocytes humains (Knutton *et al.*, 1987). Ces lésions sont caractérisées par un effacement des microvillosités, et par une accumulation d'actine cellulaire sous-jacente à la bactérie, et formant un piédestal.

2.2 Locus d'effacement des entérocytes (LEE)

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE, codant un système de sécrétion particulier, le système de type III, et trois classes de 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 en C-terminal (Frankel *et al.*, 1994). 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 récepteur eucaryote non clairement identifié.
- 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 à un système de sécrétion de type III (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*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (*Tir*, *map*, *espF*, *espG*, *espH* ...).

- Le système de sécrétion de type III : les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système 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). Le mécanisme d'activation du système de sécrétion de type III reste un point obscur, de même que les transductions de signaux responsables du réarrangement du cytosquelette des cellules hôtes (Bain *et al.*, 1998; Rosenshine, 1998).

2.3 Régulation de l'expression des gènes du LEE

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans la régulation de l'expression des gènes du LEE. 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). Cependant, la régulation du LEE semble un phénomène complexe et paraît faire intervenir d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux, par l'intermédiaire du "quorum-sensing" (qui correspond à la régulation de l'expression des gènes bactériens en fonction de la densité de la population bactérienne) (Beltrametti *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2002).

2.4 Différences entre les EPEC et les EHEC

Des différences dans l'établissement des liaisons A/E des EPEC et des EHEC ont été mises en évidence à plusieurs niveaux. Alors que le LEE des EPEC suffit seul à conférer à une souche de *E. coli* K12 la capacité de former des lésions A/E (McDaniel and Kaper, 1997), le LEE des EHEC O157 ne suffit pas (Elliott *et al.*, 1999). Des facteurs extérieurs au LEE semblent donc indispensables à leur établissement chez les EHEC.

D'autre part, un locus plasmidique nommé *per* (plasmid-encoded regulator) a été associé à la régulation positive de l'expression des gènes du LEE chez les EPEC (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Mellies *et al.*, 1999). Cet opéron est localisé sur le plasmide EAF (EPEC adhesion factor) absent des souches EHEC, et de la plupart des EPEC actuellement isolées.

Une autre différence majeure a été mise en évidence : chez les EPEC, l'activation de Tir passe par une étape de phosphorylation du résidu Tyr₄₇₄ en C-terminal, alors que cette phosphorylation n'a pas été mise en évidence chez les EHEC (DeVinney *et al.*, 1999; DeVinney *et al.*, 2001; Ismaili *et al.*, 1995; Kenny, 1999, 2001).

Cinq variants majeurs de l'intimine ont été identifiés (Oswald *et al.*, 2000). L'intimine α est retrouvée chez les EPEC isolés chez l'homme. L'intimine β a été mise en évidence chez des EPEC et EHEC de sérotype O26:H11 et O111:H⁻ isolés chez l'homme et les animaux, ainsi que chez *Citrobacter rodentium* (Higgins *et al.*, 1999). L'intimine γ a été mise en évidence chez des EPEC et EHEC de sérotype O157:H7 isolés chez l'homme et les bovins. L'intimine δ a été mise en évidence de façon plus anecdotique, et l'intimine ϵ est retrouvée chez les EHEC de sérotype O103:H2 isolés chez l'homme et les bovins. Depuis cette étude, de nouveaux variants ont été décrits (Zhang *et al.*, 2002b). Plusieurs variants ont également été décrits pour les gènes *tir*, *espA* et *espB* (China *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 1998). La partie C-terminale de l'intimine, responsable de la reconnaissance spécifique de la cellule cible, est la plus divergente. Elle pourrait être responsable de la différence de tropisme tissulaire observée entre les EPEC (au niveau de l'intestin grêle) et les EHEC (au niveau du caecum et du côlon) le long du tube digestif (Phillips and Frankel, 2000).

2.5 Autres facteurs d'adhésion décrits

Chez les STEC, différents phénotypes d'adhésion ont été observés, mais ils diffèrent selon la lignée cellulaire et le protocole expérimental utilisé, rendant la comparaison des résultats souvent hasardeuse (Izumikawa *et al.*, 1998; McKee and O'Brien, 1995; Morabito *et al.*, 1998; Nataro and Kaper, 1998; Nicholls *et al.*, 2000; Winsor *et al.*, 1992). Cependant, des études réalisées sur le modèle cellulaire Henle 407 ont montré que les souches isolées de patients atteints de SHU semblaient avoir des capacités d'adhésion supérieures à celles isolées des aliments (Paton *et al.*, 1997; Paton and Paton, 1999a). Des facteurs d'adhésion ont été partiellement caractérisés chez certaines souches, d'autres sont encore sujets à discussion :

- lha (Iron-homologue adhesin) est une protéine de 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 certains STEC *eae*-négatifs tels que les souches de sérotype O113:H21 (Tarr *et al.*, 2000). Cette protéine présente une homologie de 40 % avec la protéine IrgA de *Vibrio cholerae*. Elle est localisée au niveau du locus chromosomique TAI (tellurite resistance- and adherence-conferring island), qui confère également aux souches une résistance au tellurite. Cependant, le rôle de cette protéine dans l'adhésion aux cellules d'origine intestinale reste à établir.
- Deux protéines de membrane externe de 94 kDa et 8 kDa ont été impliquées dans l'adhésion de souches O157:H7 et O26:H11 aux cellules Henle 407 et au caecum de poulet (Sherman *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1996).
- Une adhésine auto-agglutinante codée par le gène *saa* a été décrite chez des souches STEC LEE-négatives (Paton *et al.*, 2001).
- Le gène *efa1* coderait un facteur d'adhésion potentiel chez les EHEC LEE-positifs (Nicholls *et al.*, 2000).
- L'opéron *lpf*, apparenté aux long polar fimbriae de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, semble impliqué dans l'adhésion des souches O157:H7 (Torres *et al.*, 2002) mais aussi non-O157 (Doughty *et al.*, 2002).

2.6 Rôle du lipopolysaccharide (LPS) dans l'adhésion

Les premières observations suspectaient le rôle de l'antigène O157 dans les mécanismes d'adhésion, mais il a ensuite été montré que, au contraire, les chaînes latérales antigéniques de O157 (et O111) masquaient les protéines de membrane externe véritablement impliquées dans l'adhésion (Bilge *et al.*, 1996; Cockerill *et al.*, 1996). Cependant, une étude réalisée en 1999 a montré que l'expression du LPS O113 par une souche de *E. coli* K12 augmentait de façon significative l'adhésion *in vitro* de la bactérie aux cellules Hep-2 et Henle 407 (Paton and Paton, 1999a). Cette étude suggère un rôle du LPS O113 dans l'étape de colonisation des STEC appartenant à ce sérotype.

2.7 Implication des plasmides de haut poids moléculaire dans l'adhésion

L'association entre la possession d'un plasmide de haut poids moléculaire et la capacité à adhérer aux cellules épithéliales avait été rapportée chez les STEC (Karch *et al.*, 1987; Toth *et al.*, 1990). Cependant, les études réalisées *in vivo* sur plusieurs modèles animaux montrent que le plasmide ne joue pas de rôle dans ce mécanisme (Tzipori *et al.*, 1987; Wadolkowski *et al.*, 1990a). D'autres facteurs de virulence potentiels ont été décrits sur le plasmide pO157 de 60 MDa chez les STEC de sérotype O157:H7. Cependant, leur implication dans la pathogénicité reste encore à démontrer.

3 L'entérohémolysine

3.1 Structure et mécanisme d'action de l'entérohémolysine (E-hlyA)

Un nouveau phénotype hémolytique dû à l'entérohémolysine E-hlyA a été mis 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* (Schmidt *et al.*, 1995). Le gène *ehxA* code le précurseur de la protéine de structure E-hlyA. Il présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l' α -hémolysine de *E. coli*. E-hlyC assure l'acylation post-traductionnelle de E-hlyA. E-hlyB et E-hlyD sont impliquées dans le transport et la sécrétion de E-hlyA. C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines RTX (Repeats in Toxin), son mécanisme d'action est comparable à celui de l' α -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). Cependant, l'activité de E-hlyA est moins puissante que celle de l' α -hémolysine : 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.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1995).

3.2 Rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité des STEC

Le rôle de E-hlyA dans la virulence a été suspecté à la suite de la mise en évidence d'anticorps anti-E-hlyA chez des patients (Schmidt *et al.*, 1995). Son mécanisme d'action serait lié à la libération de fer engendrée par les hématies lysées, ce qui permettrait un meilleur développement des bactéries. Le gène *ehxA* a été

localisé sur les plasmides de haut poids moléculaire de 18 % à 48 % de STEC appartenant à des sérotypes différents, d'origine humaine ou animale (Barrett *et al.*, 1992; Pradel *et al.*, 2001; Schmidt and Karch, 1996). Cependant, les souches isolées chez le malade ne possèdent pas toujours ce gène, et sa présence n'est pas statistiquement corrélée à la pathogénicité ; le rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité est donc encore discuté.

3.3 Autres facteurs plasmidiques jouant un rôle dans la pathogénicité des STEC

Une sérine protéase EspP capable de cliver le facteur V de coagulation humaine et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité (Brunner *et al.*, 1997). Cette protéine appartient à une sous-classe de la famille des IgA protéases. La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients. D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la virulence : la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi qu'un système de sécrétion de type II (Brunner *et al.*, 1996; Burland *et al.*, 1998).

3.4 Rôle de l'entérotoxine EAST1 dans la pathogénicité des STEC

Décrite chez les *E. coli* entéroagréatifs, l'entérotoxine thermostable EAST1 semble agir sur les cellules intestinales au niveau des mécanismes de sécrétion (Nataro and Kaper, 1998). Le gène *astA* codant cette toxine a été mis en évidence chez des souches de sérotype O157:H7 ainsi que dans des isolats O111:H2 de patients atteints de SHU en France, et dans une souche de sérotype O86:H⁻ au Japon (Iyoda *et al.*, 2000; Morabito *et al.*, 1998; Savarino *et al.*, 1996; Schmidt and Karch, 1996). Elle pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse observée lors des infections à EHEC. Cependant, la présence du gène *astA* n'est pas statistiquement associée à la pathogénicité des souches STEC (Bertin *et al.*, 2001 ; Livrelli et Pradel, résultats non publiés).

3.5 Implication des mécanismes de captation du fer dans la pathogénicité des STEC

La synthèse des sidérophores et de leurs récepteurs membranaires est surtout observée pour les souches responsables d'infections extra-intestinales, pour lesquelles le milieu est limitant en fer. Deux systèmes principaux ont été décrits chez les entérobactéries : l'entérochéline, codée par le chromosome, et l'aerobactine, dont l'opéron peut être plasmidique ou chromosomique, et qui n'est pas présent chez toutes les entérobactéries. Chez certains STEC non-O157:H7, un îlot de pathogénicité nommé HPI (high-pathogenicity island) a été mis en évidence (Karch *et al.*, 1999). Il est présent chez les espèces pathogènes de *Yersinia* et code le système sidérophore appelé yersiniabactine. Cet îlot semble contribuer davantage à l'adaptation des souches à certaines niches écologiques plutôt qu'à un mécanisme de virulence proprement dit. Le rôle des mécanismes de captation du fer chez les STEC reste donc à définir.

3.6 Rôle éventuel de la résistance à l'acidité dans le processus infectieux

La capacité des STEC à résister aux conditions acides rencontrées notamment lors de leur passage dans l'estomac pourrait expliquer la faible dose infectieuse. Pourtant, les rares études réalisées sur les STEC appartenant à des sérotypes non-O157:H7 semblent indiquer des propriétés similaires à la flore coliforme classique (voir Section G).

3.7 Rôle éventuel de l'uréase dans la pathogénicité des STEC

L'analyse génomique de la souche O157:H7 EDL933 a révélé la présence de deux loci portant les gènes codant l'uréase (Heimer *et al.*, 2002). Cependant ceux-ci ne semblent pas fonctionnels, et la très grande majorité des souches O157:H7 ne montre pas d'activité uréase. Les opérons seraient régulés négativement par le système Fur (Heimer *et al.*, 2002). Il a été suggéré que le locus uréase puisse être un marqueur des souches EHEC; cependant, le faible nombre de souches et de sérogroupes testés ne permet pas de l'affirmer (Nakano *et al.*, 2001). Le rôle éventuel de l'uréase dans la pathogénicité des souches STEC reste donc à démontrer.

QUESTION N°7 : QUELS SONT LES ELEMENTS MOBILES DU GENOME DES STEC ET LEUR MODE D’ACTION ?

La taille du génome des souches pathogènes de *E. coli* est supérieure de plusieurs centaines de kilobases (kb) à celle de souches non pathogènes : environ 5500 kb pour les souches O157, contre 4600 kb pour une souche banale de laboratoire (Blattner *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). Dans certains cas, ces régions supplémentaires correspondent à l'unité génomique fonctionnelle d'un bactériophage ; elles peuvent également constituer des îlots de pathogénicité ou correspondre à des plasmides. Les gènes codant les facteurs de virulence sont portés par des éléments mobiles du génome (Figure 6). L'acquisition de la majorité des facteurs de virulence pourrait donc être due à des mécanismes d'échange génétique par transfert horizontal. D'autre part, ces éléments mobiles peuvent intervenir dans la régulation de l'expression des facteurs de virulence.

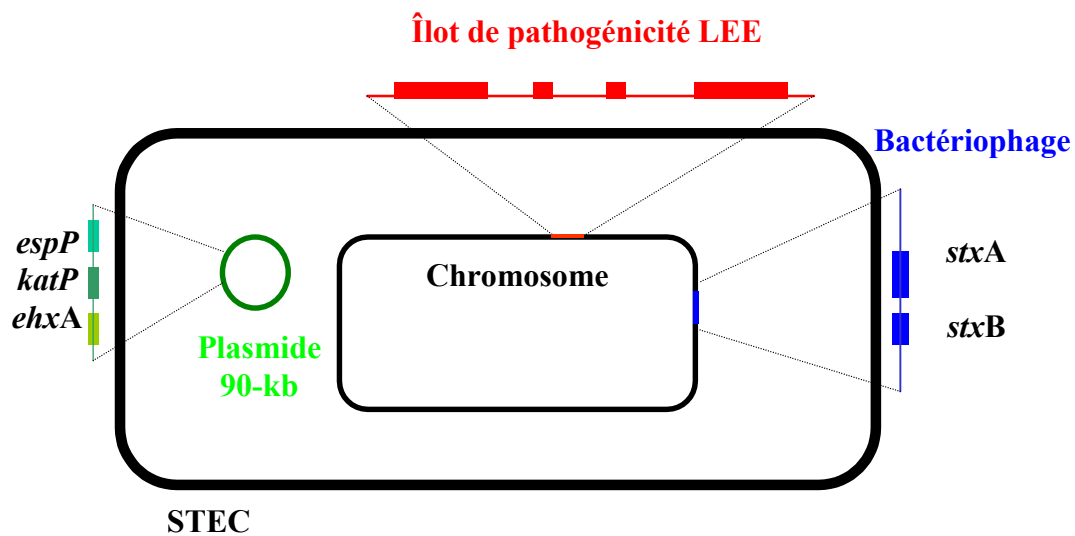


Figure 6 : Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus sont portés par les éléments mobiles du génome (d'après P. Mariani et V. Livrelli) : les gènes codant les toxines Stx (*stxA*, *stxB*) par des bactériophages, les gènes codant les fonctions d'attachement/effacement par l'îlot de pathogénicité LEE ; les gènes *espP*, *katP*, *ehxA* sont plasmidiques

1 Les bactériophages

1.1 Phages codant les toxines Stx

Plusieurs phages lysogènes codant les toxines Stx ont été identifiés : le phage H-19B codant la toxine Stx1 a été caractérisé chez la souche H19 de sérotype O26:H11, et le phage 933W codant Stx2 a été mis en évidence chez la souche EDL933 de sérotype O157:H7 (Smith *et al.*, 1983; Strockbine *et al.*, 1986). H-19B semble morphologiquement proche du phage Lambda (λ), alors que 933W est plus proche du phage P22 (Figure 7). Le séquençage récent du génome de la souche de référence EDL933 a permis de localiser un phage, CP-933V, porteur du gène *stx*₁ (Perna *et al.*, 2001). Celui-ci paraît cryptique, alors que 933W est capable de produire des particules virales. Tous les phages "stx" décrits conservent la même organisation génique : une région impliquée dans la morphogénèse du phage, une zone permettant les mécanismes de recombinaison, puis de régulation, réplication, et enfin une région impliquée dans l'étape de lyse. C'est dans cette dernière qu'est localisé l'opéron *stx*.

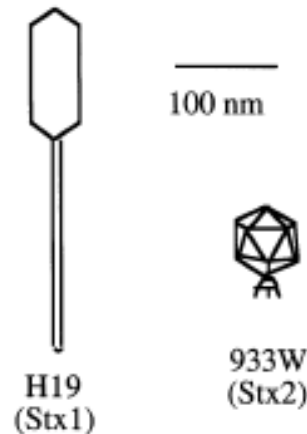


Figure 7 : Morphologie des deux bactériophages, support des gènes codants les Shiga-toxines Stx 1 et Stx 2 (d'après Ackermann and Dubow, 1987).

1.2 Phages dans la régulation de l'expression des toxines Stx

Les bactériophages joueraient un rôle sur l'expression des toxines Stx, d'une part avec l'augmentation du nombre de copies de l'opéron *stx* au moment de la réplication du phage, d'autre part grâce à l'action de deux promoteurs de transcription (Figure 8) (Wagner *et al.*, 2001; Waldor, 1998). L'un des promoteurs est localisé immédiatement en amont de l'opéron *stx* et permet l'expression de la toxine à un niveau de base, pendant le cycle lysogénique. Le second correspond au promoteur tardif du phage λ , activé au moment du cycle lytique par l'expression de l'anti-terminateur de transcription Q, localisé en amont de l'opéron *stx* chez les phages 933W et H-19B (Neely and Friedman, 1998). Le séquençage du génome de 933W a montré que les gènes *stx* faisaient partie des transcrits de régulation tardive (Plunkett *et al.*, 1999). D'autre part, les séquences adjacentes aux gènes *stx* semblent influencer le taux de production des toxines (Wagner *et al.*, 1999) et pourraient donc jouer un rôle sur le pouvoir pathogène des STEC. Enfin, la régulation de l'expression des toxines semble différente selon les variants étudiés. Il semblerait que, lors de carence en fer ferrique, la région amont de l'opéron *stx*₁ permette une régulation positive de l'expression de la toxine, grâce au système *fur* (Calderwood and Mekalanos, 1987). Une telle régulation par le fer n'a pas été mise en évidence pour l'expression de *stx*₂.

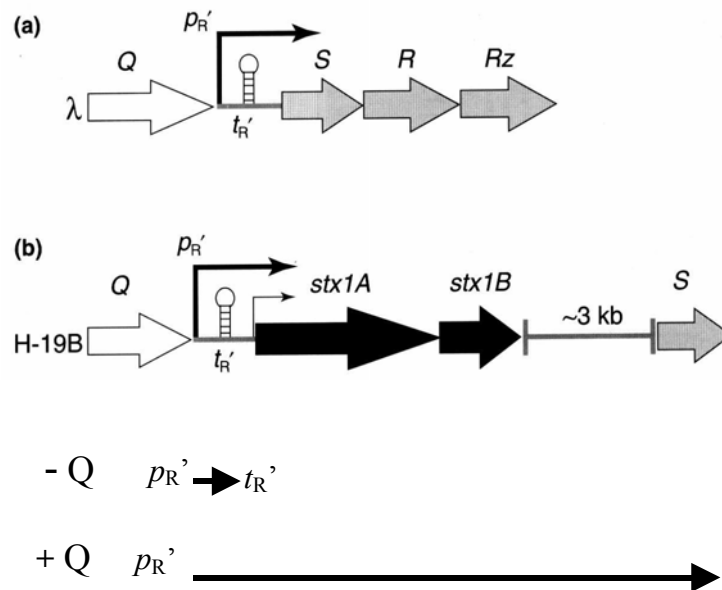


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation génomique des phages λ (a) et H-19B (b) (V. Livrelli, N. Pradel, d'après Waldor, 1998). Les gènes codant Stx1 (stx_{1A} , stx_{1B}) sont localisés en aval d'un gène homologue à celui de l'anti-terminateur de transcription Q de λ , suivi du promoteur tardif p_{R'} et du terminateur de transcription t_{R'}. Le promoteur localisé immédiatement en amont des gènes stx est également représenté. Les gènes S, R et Rz correspondent aux gènes de lyse. Les transcrits en présence et en absence de l'anti-terminateur Q sont représentés par des flèches situées en bas de la figure

1.3 Transduction des gènes stx

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré l'induction du cycle lytique des phages porteurs des gènes *stx* et la conversion de souches de *E. coli* (c'est à dire le passage des phages d'une souche à une autre) (Iyoda *et al.*, 2000; Muniesa and Jofre, 2000; Schmidt *et al.*, 1999a). La conversion de souches *in vivo* dans le milieu intestinal des bovins ou chez l'homme est donc probable. Acheson *et al.* (1998) ont montré qu'un phage codant Stx1 pouvait être transféré à une souche de *E. coli* K-12 dans le tractus gastro-intestinal murin. De tels événements expliqueraient également la production de Stx par *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae*, associés à des cas de SHU (dans ces espèces, les gènes *stx* sont très instables) (Paton and Paton, 1998b). Enfin, en pathologie humaine, la coinfection par des souches de sérotypes différents a été rapportée. Cette co-infection pourrait être due au transfert horizontal des gènes *stx*, d'une souche à d'autres souches de la flore intestinale du patient. Il pourrait donc y avoir "coopération" de plusieurs souches lors du développement de la pathologie.

2 Les îlots de pathogénicité

L'évolution des bactéries pathogènes semble avoir été marquée par l'acquisition d'îlots de pathogénicité (PAI). Les PAI constituent de véritables cassettes de virulence insérées dans le chromosome (Hacker *et al.*, 1997). Ils sont définis par plusieurs caractéristiques :

- ils sont généralement absents des bactéries non pathogènes appartenant à la même espèce ;
- ils sont constitués d'un groupe de gènes de virulence, dont des gènes codant des toxines, des adhésines, des invasines, des systèmes chélateurs du fer, et des systèmes d'export de facteurs de virulence ;
- leur pourcentage de G+C est différent de celui du reste du chromosome ;
- ils occupent généralement une région chromosomique de plus de 30 kb, mais leur taille peut varier de 5 à 200 kb ;
- ils se situent à proximité de loci codant les ARNt, et au niveau de séquences d'insertion ;

- ils portent des intégrases d'origine phagique, des transposases, et des origines de répllication plasmidiques, souvent cryptiques. La présence de ces séquences suggère un mécanisme d'intégration de l'ADN étranger par l'intermédiaire de transposons, intégrons, phages ou plasmides. Certains auteurs ont ainsi avancé l'idée que les bactériophages ou les plasmides pourraient être les précurseurs des PAI (Hacker *et al.*, 1997).

2.1 PAI décrits chez les STEC

- **Le LEE** (Locus of Enterocyte Effacement), qui est composé de 5 opérons impliqués dans la formation des lésions A/E chez les EPEC et les STEC (McDaniel *et al.*, 1995; Sperandio *et al.*, 1998). Sa taille est de 35 kb (41 cadres de lecture ouverts) chez les EPEC et de 43,4 kb (54 cadres de lecture ouverts) chez les STEC. Les 13 cadres de lecture supplémentaires des STEC de sérotype O157:H7 sont regroupés dans la région 5' du LEE, et correspondent à la séquence d'un prophage de la famille P4 appelé 933L (Perna *et al.*, 1998). Chez les souches de référence EPEC E2348/69 et EHEC EDL933, il est situé à 82 minutes sur le chromosome, immédiatement en aval du locus *se/C* (Hacker *et al.*, 1997; McDaniel *et al.*, 1995). Le LEE a également été localisé au niveau des sites *pheU* et *pheV* chez certaines souches STEC, et il semblerait que d'autres sites d'insertion existent (Jores *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 1998).

- **Le HPI** (high pathogenicity island) est un îlot de pathogénicité de 45 kb, récemment mis en évidence chez les STEC (Karch *et al.*, 1999). Il avait d'abord été décrit chez les espèces pathogènes de *Yersinia*. Cet îlot code un système chélateur du fer qui permettrait l'adaptation des bactéries à certaines niches écologiques. Il a été mis en évidence chez des STEC de sérotypes divers dont O26:H11 et O128:H2, mais pas chez les souches O157:H7.

- Deux îlots de **résistance au tellurite**, qui paraissent correspondre à la définition d'îlots de pathogénicité, ont été décrits chez O157:H7 (Perna *et al.*, 2001). Récemment, le facteur d'adhésion *Iha* a été mis en évidence sur l'un des locus, appelé tellurite resistance- and adherence-conferring island (TAI) (Tarr *et al.*, 2000).

2.2 Rôle des PAI dans la régulation

Les PAI, même s'ils constituent des unités génétiques compactes et distinctes du reste du chromosome, peuvent jouer un rôle sur la régulation d'autres gènes. Cette fonction régulatrice peut être directe si le PAI code des gènes de régulation : c'est le cas par exemple de *Ler* (LEE encoded regulator) chez les EPEC et les EHEC (Elliott *et al.*, 2000). La régulation peut être indirecte par inactivation des ARNt adjacents (Ritter *et al.*, 1995). D'autre part, l'insertion d'un PAI au niveau du site *se/C* diminue la croissance des bactéries en anaérobiose. L'instabilité des îlots peut donc être à l'origine de mutations et modifier l'expression d'autres facteurs (Hacker *et al.*, 1997).

3 Les plasmides

3.1 Plasmide pO157

La plupart des souches STEC de sérotype O157:H7 possède un plasmide de 92 kb appelé pO157 (Karch *et al.*, 1987). Les plasmides pO157 de deux souches de référence, EDL933 isolée aux États-Unis en 1982, et O157Sakai isolée au Japon en 1996, ont été entièrement séquencés (Burland *et al.*, 1998; Makino *et al.*, 1998) : pO157 est de nature mosaïque et comporte des éléments IS. Une centaine de cadres de lecture ouverts ont été mis en évidence, parmi lesquels une vingtaine semble correspondre à des gènes de virulence potentiels.

Des plasmides de petite taille (3 à 6 kb) ont également été décrits chez les STEC de sérotype O157:H7, et synthétisent des colicines.

3.2 Plasmides de STEC de sérotypes non-O157:H7

En 1992, Barrett *et al.* ont mis en évidence la présence de plasmides de taille variable, porteurs du gène *ehxA*, chez des STEC d'origine bovine (Barrett *et al.*, 1992). Au cours d'autres études, leur présence a été détectée dans 18 à 30 % des STEC isolés chez les bovins. La comparaison des plasmides de haut poids moléculaire de STEC de divers sérotypes a permis de souligner une hétérogénéité dans leur composition. La recherche des gènes *espP*, *katP* et *ehxA* a donné toutes les combinaisons possibles ; certains plasmides ne portaient aucun des 3 gènes recherchés (Brunner *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 2001).

4 Les vésicules membranaires

Plusieurs études ont permis d'émettre l'hypothèse d'un mécanisme de transfert de gènes de virulence par des vésicules membranaires (MV) chez différentes bactéries entériques (Beveridge, 1999). Ces vésicules peuvent contenir différents types de molécules telles que des toxines bactériennes, ainsi que des fragments d'ADN chromosomique, plasmidique, et phagique. Le transfert de gènes *stx* par ce mécanisme a été démontré chez *E. coli* O157:H7 (Kolling and Matthews, 1999; Yaron *et al.*, 2000). La production de toxines Stx1 et Stx2 chez des bactéries réceptrices de ces vésicules a également été mise en évidence (Yokoyama *et al.*, 2000). Cependant, le rôle véritable de ces vésicules dans l'environnement et chez l'hôte est encore à démontrer.

QUESTION N°8 : QUELS SONT LES ELEMENTS DE PHYLOGENIE DES STEC ?

1 Origine de l'espèce *E. coli*

Des études phylogénétiques basées sur le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal 16S ont montré que *E. coli* et *Salmonella* auraient divergé à partir d'un ancêtre commun il y a 120 à 160 millions d'années, au début des mammifères. Les *Shigella* auraient émergé des *E. coli* au moment des premiers primates il y a environ 80 millions d'années. Par hybridations ADN-ADN, Brenner *et al.* (1972) ont montré que *Shigella* et *E. coli* partageaient plus de 75 % d'homologie ce qui justifierait l'appartenance des *Shigella* à l'espèce *Escherichia coli*.

De plus la position des *Shigella* et des *E. coli* a été clarifiée par analyse en MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) : Pupo *et al.* (1997) ont montré que les *E. coli* entéroinvasifs, entérotoxigènes et entérotoxigènes étaient répartis en plusieurs lignées à l'intérieur des groupes phylogénétiques A et B1. Le groupe B2 était relié aux souches responsables d'infections du tractus urinaire, bactériémies et méningites néonatales mais pas aux souches diarrhéiques. Les EIEC, EPEC, ETEC et les shigelles ont dû évoluer de façon indépendante en différentes lignées en plusieurs étapes, probablement avec l'acquisition horizontale de facteurs de virulence (Johnson, 2000).

2 Origine des EHEC

L'analyse moléculaire et la comparaison de la distribution des gènes spécifiques de virulence ont montré que les EHEC auraient probablement acquis récemment la plupart de leurs facteurs de virulence par transfert horizontal de matériel génétique. L'explication logique de l'émergence des EHEC comme un agent pathogène majeur serait la présence de ces gènes sur des éléments mobiles, comme les gènes *stx*₁ et *stx*₂ (Shiga-toxines 1 et 2) 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 EHEC (pO157), qui auraient été transmis horizontalement en différentes étapes.

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC, sachant que les relations clonales entre les EPEC et les EHEC sont assez complexes, et que de nombreuses souches appartiennent à des sérotypes communs aux deux pathovars.

Les EHEC seraient un groupe de clones dérivant des *E. coli* entérotoxigènes (EPEC) (Whittam *et al.*, 1993) : ceci s'expliquerait par le fait que des gènes comme le gène d'attachement et d'effacement (*eae*) auraient été transférés d'une souche pathogène à une souche de *E. coli* commensale qui serait devenue pathogène. Pupo *et al.* (1997) confirment cette hypothèse en suggérant que les souches pathogènes de *E. coli* seraient apparues de plusieurs ancêtres en plusieurs étapes. De plus l'instabilité génomique est un phénomène qui est devenu actuellement d'un grand intérêt (Reid *et al.*, 2000).

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). En effet, l'analyse des sites d'insertion du LEE et des variants du gène *eae* chez les EPEC et les EHEC montre que le LEE aurait été acquis au niveau du site *se/C* chez le clone EPEC à l'origine du groupe EHEC-1 (γ -intimine), et au niveau du site *pheU* chez le clone à l'origine de EHEC-2 (β -intimine) (Agin and Wolf, 1997). Plus récemment, deux autres lignées ont été proposées sur la base des profils MLEE et sur la comparaison des séquences de 7 gènes conservés : l'une, appelée STEC 1 regroupe les souches possédant l'antigène flagellaire H21; l'autre, nommée STEC 2, comprend les souches O103:H2 et O45:H2 (Reid *et al.*, 2000), [http:// www.shigatox.net/stec/clonal.html](http://www.shigatox.net/stec/clonal.html).

3 Origine du clone O157

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par Feng *et al.* (1998) basé sur des événements qui seraient intervenus à partir d'un ancêtre génétiquement le plus proche des EHEC O157:H7, le sérotype EPEC O55:H7 (β -glucuronidase positive et fermentant le sorbitol) (Figure 9). Ces deux lignées auraient émergé à partir d'un ancêtre commun possédant l'îlot de pathogénicité LEE, il y a au moins trente mille ans. Selon ce modèle, la première étape à l'origine de la séparation des deux lignées aurait été l'acquisition du gène *stx*₂ (Shiga-toxine 2) vraisemblablement par transduction avec des phages, il en résulte l'émergence d'un clone O55:H7 *stx*₂-positif puis plus tard l'acquisition d'une région *rfb* codant des hémolysines et la région *rfb* (nécessaire à la synthèse de l'antigène O157), modifiant l'antigène O55 en O157, et plus récemment un gène de Shiga-toxine 1 (*stx*₁). Ce clone aurait perdu plus récemment encore la capacité à fermenter le sorbitol et à produire une activité β -glucuronidase fonctionnelle par une mutation T->G en position 92 du gène *uidA* (Park *et al.*, 2001). Ce clone aurait également acquis le plasmide de virulence pO157 et aurait donné naissance au clone O157:H7 "sorbitol -" de répartition mondiale (Feng *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2000).

Par la suite, cette lignée aurait perdu la mobilité et donné naissance au clone O157:H- fermentant le sorbitol, isolé en Allemagne.

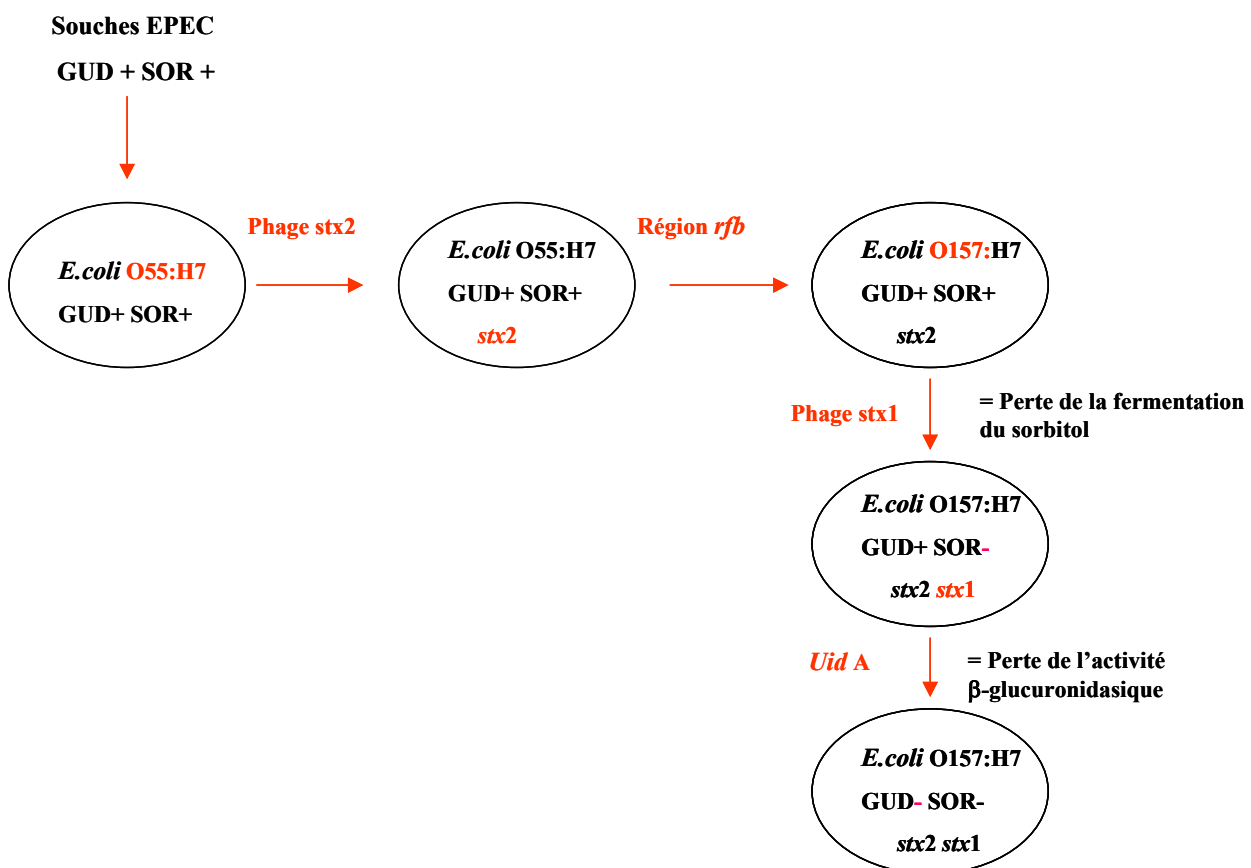


Figure 9 : Modèle hypothétique de l'émergence de *E. coli* O157:H7 basé sur les mutations dans le gène *uidA*, la production de vérotoxine et les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase (Feng *et al.*, 1998)

3.1 Relations clonales entre les souches O157:H7

Les études de clonalité réalisées sur les souches de sérotype O157:H7 suggèrent la répartition mondiale d'un seul clone, très conservé (Allison *et al.*, 2000; Heuvelink *et al.*, 1995). Il existe cependant des "sous-populations" qui diffèrent en fonction de l'origine géographique des souches O157 (Kim *et al.*, 2001). D'autre part, Baker *et al.* suggèrent l'existence de deux clones O157:H7 aux Etats-Unis, l'un associé au réservoir bovin, l'autre retrouvé en situation pathogène chez l'homme : le clone isolé de bovins semble moins virulent sur un modèle de porcelets gnotobiotiques (Baker *et al.*, 1997). Cette hypothèse a été confirmée par Kim *et al.* sur la base des profils des souches obtenus par la méthode OBGS (Octamer-based genome scanning) : bien que toutes les souches O157:H7 étudiées possèdent les mêmes facteurs de virulence, certains clones (fréquents chez les bovins mais jamais isolés de cas de SHU chez l'homme) seraient soit moins efficacement transmis à l'homme, soit moins pathogènes (Kim *et al.*, 1999).

3.2 Relations clonales entre les STEC de sérotypes non-O157:H7

Concernant les STEC non-O157:H7, plusieurs études ont montré que les souches pathogènes de même sérotype, isolées dans différents pays, à plusieurs années d'intervalle, sont génétiquement proches et appartiennent à un même clone.

A titre d'exemple, les souches de sérotype O103:H2 isolées de patients atteints de SHU en France et en Allemagne semblent avoir une origine clonale commune, mais ne correspondent pas au même clone que les souches EPEC O103:H2 responsables de diarrhées chez les lapins (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 1993). De même, l'analyse des relations entre des souches STEC O26:H11 ou H-, O103:H2 et O111:H- par la technique RAPD a montré une relation étroite entre les souches pathogènes de même sérotype (Schmidt *et al.*, 1999b). Par contre, une relation clonale plus distante a été mise en évidence entre les sérotypes, ainsi qu'avec les souches O157:H7. Il semble donc que les STEC O26, O103:H2, O111:H- et O157:H7 appartiennent à des lignées évolutives différentes, qui auraient émergé indépendamment les unes des autres. Certaines de ces lignées pourraient être particulièrement aptes à subir des événements de transferts horizontaux, comme cela a été montré pour O91:H21 (Pradel *et al.*, 2002).

Les souches pathogènes isolées chez l'homme appartiendraient donc à un nombre limité de clones. Cependant, la conversion de souches par des phages porteurs des gènes *stx* est facilement réalisable *in vitro* (Schmidt *et al.*, 1999a), et la possibilité de voir émerger de nouveaux clones pathogènes est donc tout à fait plausible.

4 Evolution des gènes de pathogénicité des STEC

La comparaison des séquences des Shiga-toxines a montré que le gène *stx*₁ est très conservé et est pratiquement identique à celui de *Shigella dysenteriae*, mais par contre *stx*₂ est beaucoup moins conservé ce qui a conduit à distinguer plusieurs sous-types de *stx*₂, suggérant que *stx*₂ est entré dans *E. coli* avant *stx*₁. Différents auteurs ont montré qu'il existerait 4 grandes lignées à l'intérieur du gène *stx*₂ : la première regroupant *stx*₂ et les variants *stx*_{2c}, *stx*_{2vha}, et *stx*_{2vhb} dans laquelle on rencontre le plus souvent les formes sévères, la deuxième regroupant le variant *stx*_{2d}, la troisième le variant *stx*_{2e}, et la quatrième le variant *stx*_{2ev}.

Plusieurs phages tempérés portant *stx* peuvent être présents simultanément sur le chromosome des STEC (*stx*₁ et *stx*₂, ou phages différents *stx*₂). Il a été observé que des recombinaisons peuvent intervenir entre les phages *stx*. Il existe une corrélation mais qui n'est pas totale entre *stx*₁ ou *stx*₂ et les sérotypes STEC ce qui peut expliquer une certaine stabilité des phages *stx* dans les souches STEC. La présence des phages dans le milieu environnemental explique leur dispersion ce qui facilite la lysogénéisation des souches de *E. coli* par ces phages *stx*, en donnant des générations de nouvelles souches STEC (Boerlin, 1999).

Le LEE (Locus d'Effacement de l'Entérocyte) a été découvert d'abord chez les EPEC puis chez les STEC. Le gène *eae* codant l'intimine a été étudié par Boerlin *et al.* (1998) qui distinguent deux groupes, le premier contenant l'intimine des sérotypes O157:H7, et H-, O145:H-, O111:H8 et H-, le deuxième les sérotypes O26:H11, et H-, et O103:H2. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kaper *et al.* (1998) qui suggèrent que les souches ayant les gènes *eae* identiques partagent également des gènes *esp* identiques. Ceci est en désaccord avec les résultats de la phylogénie des O111:H8 et de O26:H11 qui sont très proches, mais qui ont un site d'insertion du LEE identique et des gènes *eae* de lignée différente. Perna *et al.* (1998) confirme que la distribution des mutations n'est pas homogène à l'intérieur du LEE.

Il n'y a pas d'évidence pour une récente mobilité des gènes *eae* ou de l'îlot de pathogénicité LEE. Bien que le LEE soit rare (moins de 10 %) chez les *E. coli* de l'environnement, il semblerait qu'il aurait été acquis en plusieurs fois. On peut noter que les séquences des intimines α , β , et γ divergent beaucoup (plus de 15 %) par rapport à des structures allèles en mosaïque suggérant que le LEE s'est diversifié par mutation et recombinaison. L'analyse phylogénique suggère que, par gain et perte d'éléments mobiles intervenant plusieurs fois, il y aurait eu insertion dans le chromosome de l'îlot de pathogénicité LEE. Pour 2 lignées EHEC, le procédé aurait coïncidé avec le gain des gènes *stx*. Au contraire, les lignées EPEC auraient gagné le plasmide EAF (Reid *et al.*, 2000).

Le plasmide de l'entérohémolysine des EHEC est non-conjugatif, mais relativement constant à l'intérieur du sérotype. Celui des souches de sérotype O157:H7 (ou pO157), qui a été séquencé, présente une structure en mosaïque qui est issue de multiples recombinaisons avec de l'ADN étranger. Burland *et al.* (1998) soutiennent l'hypothèse de l'intégration de fragments d'origine différente dans le plasmide F-like pour donner l'actuel pO157. Malheureusement, nous n'avons pas de séquence complète valable de l'entérohémolysine pour les autres STEC.

Par ailleurs, il existerait une relation entre le plasmide de l'hémolysine-EHEC et le LEE des STEC. Deux groupes distincts de plasmides de l'entérohémolysine peuvent être observés pour *ehxA* : le groupe I associé aux sérotypes ayant le gène *eae*, le groupe II associé aux sérotypes sans gène *eae*. Une évolution clonale et parallèle du plasmide et du LEE dans les souches STEC pourrait expliquer cette corrélation. Ceci est en accord avec l'hypothèse de Whittam (1993) qui suggère que le plasmide pO157 a dû être acquis très tôt dans l'évolution des O55:H7 en O157:H7. D'autres hypothèses suggèrent que le LEE a été transmis horizontalement en une seule fois à une souche de *E. coli* et changé ultérieurement sa localisation au niveau du chromosome en plusieurs occasions sans transfert horizontal supplémentaire (Boerlin, 1999).

5 Analyse comparative du génome des souches EHEC EDL 933 et Sakai

Le génome de deux souches de référence de sérotype O157:H7 (EDL933 aux Etats-Unis et Sakai au Japon) a été entièrement séquencé (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). Ces génomes ont été comparés à celui de la souche de laboratoire *E. coli* K12 : le génome des souches O157:H7 est 20 % plus grand que celui de la souche K12. Les deux souches auraient divergé il y a environ 4,5 millions d'années (Reid *et al.*, 2000). L'analyse des séquences a permis de mettre en évidence 177 îlots génomiques spécifiques de EDL933 variant de 50 pb à 88 kb : ces îlots représentent au total 1,34 Mb de séquence spécifique, et portent environ 26 % des gènes de EDL933. Parmi les 177 îlots décrits, 9 de taille supérieure à 15 kb sont susceptibles de coder des facteurs de virulence potentiels, 59 ne contiennent aucun gène dont la fonction soit connue. Quelques îlots de taille moins importante pourraient également être impliqués dans la virulence, ils codent par exemple des systèmes de synthèse de fimbriae. Dix-huit îlots semblent dériver de bactériophages, mais parmi eux, seul BP-933W, qui code le gène *stx*₂, paraît capable d'être induit pour produire des particules infectieuses, les autres correspondraient à des phages cryptiques. Leur taille varie de 7,5 kb (CP-933L) à 61,6 kb (BP-933W) et ils semblent constitués d'une mosaïque de segments correspondant à des bactériophages différents.

Seul le génome de la souche Sakai est complet et correctement annoté. Nous proposons donc d'utiliser la souche Sakai comme souche de référence (<http://genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/bacteria/o157/>).

Les deux génomes O157 sont presque identiques à l'exception d'une inversion d'un segment de 420 kb, d'une duplication d'un élément phagique de 86 kb et de l'absence d'un phage Mu-like. Ils diffèrent également de plus de 16 régions importantes incluant 2 séquences d'insertion et la région interne du génome de 10 prophages lambda-like.

Les résultats de cette comparaison ont montré que les événements de transfert horizontal étaient beaucoup plus nombreux qu'on ne l'avait d'abord supposé. L'analyse de Ohnishi *et al.* (2001) révèle un surprenant grand nombre de prophages dans O157, la plupart étant des phages lambda-like très proches et montre que ces bactéries peuvent fonctionner comme une machine à phages libérant des phages dans l'environnement.

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Améliorer la connaissance de la spécificité des souches STEC pathogènes pour l'homme, afin de mieux déterminer sur quels critères une souche isolée de l'animal ou d'un aliment est potentiellement pathogène pour l'homme :
 - Mieux connaître les facteurs permettant la colonisation du tube digestif de l'homme (rôle des facteurs d'adhésion, de la flore intestinale, de la réponse inflammatoire...);
 - Mieux connaître la régulation de l'expression des facteurs de virulence chez les souches STEC pathogènes pour l'homme ;
 - Mieux connaître le rôle des phages dans l'émergence des clones pathogènes et dans l'expression *in vivo* de la toxine ;
 - Développer la génomique comparative des STEC pathogènes pour l'homme : programme de séquençage des génomes O91, O26, O103,O111 ..., développement de puces à ADN, analyses phylogéniques ...
- ➔ Déterminer les facteurs de sensibilité de l'hôte.

Section D : Epidémiologie Humaine des STEC

Responsable de section : E. Espié

Rédacteurs : E. Espié – V. Leclerc

Personnalités consultées : H. de Valk – S. Haeghebaert – V. Vaillant

POINTS A RETENIR

- En France, les infections à STEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. La surveillance des infections à STEC est basée sur la surveillance des syndromes hémolytiques et urémiques (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.
- L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est inférieure à 1 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans ; elle est du même ordre de grandeur que celles observées dans d'autres pays européens.
- En France, la détection de cas groupés de SHU liés à une infection à STEC donne lieu à la mise en œuvre d'une enquête épidémiologique, alimentaire et environnementale pour identifier l'origine et la source de contamination et proposer des mesures de contrôle et de prévention.
- Depuis 1996, aucune épidémie de grande ampleur n'a été rapportée en France, contrairement à ce qui a pu être décrit au Royaume-Uni, aux Etats-Unis et au Japon.
- Dans le monde, les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies d'infections à STEC sont : viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, produits laitiers non pasteurisés, produits végétaux crus ou non pasteurisés (salade, radis blancs, jus de pommes), eau de distribution.
- La transmission de personne à personne et par contact avec des animaux de ferme ou leur environnement ont également été incriminés dans la survenue d'infections à STEC ou de SHU.

QUESTION N°9 : QUEL EST LE SYSTEME DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS A STEC EN FRANCE ?

En France, la recherche de STEC dans les selles n'étant pas effectuée en routine dans les laboratoires d'analyses médicales (De Valk and Decludt, 1997), la surveillance des infections à STEC est basée sur la surveillance des Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU), chez les enfants de moins de 15 ans.

Cette surveillance a été mise en place en 1996, par le Réseau National de Santé Publique (devenu Institut de Veille Sanitaire (InVS)), à la suite d'une étude rétrospective concernant les années 1995 à 1996, qui a montré que 86 % des SHU pédiatriques en France survenaient suite à une infection à STEC (Decludt, 1998). Elle repose sur un réseau de néphrologues pédiatres de 30 services de pédiatrie de centres hospitaliers universitaires et généraux, répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain, qui participent volontairement (Decludt, 1998; Decludt *et al.*, 2000).

Les objectifs de cette surveillance sont de suivre les tendances spatio-temporelles du SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans, de connaître les caractéristiques épidémiologiques des cas et de détecter des phénomènes épidémiques.

Un cas de SHU est défini comme un enfant de moins de 15 ans, pour lequel un diagnostic clinique de SHU (début brutal d'une anémie hémolytique avec insuffisance rénale) a été posé selon les critères biologiques suivants : anémie hémolytique micro-angiopathique (hémoglobine <10 g/100 mL et schizocytose ≥ 2 %) et insuffisance rénale (créatininémie >60 $\mu\text{mol/L}$ si âge <2 ans, >70 $\mu\text{mol/L}$ si âge >2 ans).

Un cas d'infection à STEC est confirmé par l'isolement de souches de STEC ou la détection par PCR des gènes codant pour les Shiga-toxines directement dans les selles, ou par une réponse anticorps (IgA, IgM) positive dirigée contre le lipopolysaccharide (LPS) d'un des 26 sérogroupes actuellement testés (O1, O2, O4, O5, O9, O25, O26, O29, O55, O100, O103, O104, O105, O111, O112, O113, O115, O118, O127, O128, O136, O145, O153, O157, O163, O164).

Pour chaque cas, une fiche de renseignements, comportant des informations socio-démographiques (âge, sexe...), cliniques (diarrhée prodromique sanglante...), biologiques (hématologie, biochimie, coproculture et sérologie) et épidémiologiques (notion d'autres cas de diarrhée ou de SHU dans l'entourage, exposition à des facteurs de risque connus : consommation de lait ou de fromage non pasteurisé, consommation de steak haché peu cuit, contact avec des animaux de ferme, notion de baignade) est adressée à l'InVS.

Pour chaque cas, deux prélèvements de sérum réalisés à 15 jours d'intervalle sont adressés à l'Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Émergentes à l'Institut Pasteur de Paris, pour recherche d'anticorps dirigés contre le LPS des 26 sérogroupes de STEC. Les données collectées font ensuite l'objet d'une synthèse annuelle (Haeghebaert *et al.*, 2002b).

L'exhaustivité des notifications de SHU à l'InVS n'a pas été évaluée, mais il est probable qu'elle soit très bonne du fait de la rareté et de la gravité de la maladie (nécessité d'une hospitalisation dans un service spécialisé), de la participation volontaire des néphrologues pédiatres et du suivi régulier des notifications, réalisé à partir des demandes de sérodiagnostic à l'Institut Pasteur de Paris (Haeghebaert *et al.*, 2002b).

En 2002, un Centre National de Référence (CNR) des *Escherichia coli* et *Shigella* (Unité Biodiversité des Bactéries pathogènes émergentes, Institut Pasteur-Paris) et un laboratoire associé (Service de microbiologie, Hôpital Robert Debré-Paris) ont été créés, conformément à l'arrêté ministériel du 29 juin 2001, pour contribuer à la surveillance des infections à STEC en France.

QUESTION N°10 : QUELS SONT LES PRINCIPAUX SEROGRUPES DE STEC RESPONSABLES D'INFECTIONS CHEZ L'HOMME ?

Le sérotype de STEC le plus fréquemment mis en cause lors d'infections sporadiques ou d'épidémies est *E. coli* O157:H7. D'autres sérogroupes non-O157 (O26, O103, O111, O121, O145, O153, etc) sont aussi impliqués dans la survenue d'infections à STEC et de SHU (Caprioli *et al.*, 1994; Gerber *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 1996; Tarr, 1995), mais leur fréquence réelle est difficile à estimer du fait le plus souvent de méthodes de détection inadaptées ou d'absence de recherche (Griffin *et al.*, 2000). En effet, la recherche de STEC est souvent limitée à *E. coli* O157, plus facilement détectable (voir Section F) et seul sérotype actuellement réglementé par la législation européenne (voir Section J-Question n°46).

Par ailleurs, certains patients atteints de SHU peuvent être co-infectés par un STEC non-O157 et *E. coli* O157:H7 (Tarr, 1995).

1 En France

Du fait de l'absence de surveillance épidémiologique des infections gastro-intestinales à STEC, la répartition des sérogroupes n'est connue que dans le cas des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU).

De 1995 à 2001, la moitié des cas de SHU, pour lesquels une sérologie a été réalisée, était associée à une sérologie positive à STEC (55 %), avec une forte proportion du sérotype O157 (86%) (Haeghebaert *et al.*, 2003), ce qui est du même ordre de grandeur que dans les autres pays européens.

Une réponse anticorps positive a été retrouvée pour 14 autres sérogroupes, pour les SHU notifiés depuis 1993. Ces sérogroupes, isolés ou associés à d'autres sérogroupes, étaient les suivants : O103 (9 cas), O9 (2 cas), O26 (2 cas), O105 (1 cas), O111 (1 cas), O113 (1 cas), O115 (1 cas), O145 (1 cas), O153 (2 cas), O163 (1 cas), O157+O103 (18 cas), O157+O4 (2 cas), O157+O145 (2 cas), O157+O153 (2 cas), O157+O113 (1 cas), O157+O5 (1 cas), O157+O164 (1 cas), O157+O115 (1 cas), O103+O2 (1 cas), O103+O128 (1 cas), O104+O1 (1 cas), O157+O128+O103 (1 cas), O103+O111+O157 (1 cas), O9+O2+O164 (1 cas) (Haeghebaert *et al.*, 2003).

2 En Europe

E. coli O157:H7 reste le principal sérotype incriminé dans la survenue de SHU en Europe (Bitzan *et al.*, 1993; Siegler, 1995). Ainsi, 42 % des SHU étaient liés à *E. coli* O157 en Italie de 1988 à 2000 (Tozzi *et al.*, 2001), 56 %, au Danemark de 1997 à 2000 (Scheutz *et al.*, 2001), 57% en Allemagne et Autriche de 1997 à 2000 (Gerber *et al.*, 2002). Cependant, ces dernières années, la proportion des SHU due à des sérogroupes non-O157 (O26, O111, O103) est en augmentation, notamment en Italie (Caprioli *et al.*, 1994), en Allemagne et Autriche (Beutin *et al.*, 1998; Gerber *et al.*, 2002).

3 Dans les autres pays

Aux Etats-Unis, la fréquence estimée des infections liées aux STEC non-O157 est quasi identique à celles dues au sérotype O157 (Acheson *et al.*, 2000 ; Griffin *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2002).

Au Brésil, ce sont les sérogroupes non-O157 qui sont majoritairement isolés chez les patients présentant une diarrhée (Guth *et al.*, 2000; Irino *et al.*, 2000).

En Australie, le sérotype O157:H7 est rare ; ce sont les STEC non-O157, et principalement le sérotype O111 : H-, qui sont à l'origine d'infections sévères et d'épidémies (Elliott *et al.*, 2001).

QUESTION N°11 : QUELLE EST LA REPARTITION DES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DES INFECTIONS A STEC ?

E. coli O157:H7 est à l'origine de tableaux cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU) surtout chez l'enfant ou un purpura thrombotique thrombopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr, 1995).

Peu de données sur les autres sérogroupes de STEC que O157 sont disponibles dans la littérature, même s'il semble que les STEC non-O157 soient à l'origine des mêmes signes cliniques que ceux causés par *E. coli* O157 : diarrhées non sanglantes (Beutin *et al.*, 1998), colites hémorragiques (Nataro and Kaper, 1998; Scheutz *et al.*, 2001) et SHU (Beutin *et al.*, 1998; Caprioli *et al.*, 1994; Scheutz *et al.*, 2001).

Les données de surveillance, issues d'études prospectives, ont montré qu'en Europe, les diarrhées sanglantes représentaient 41 % des infections à STEC au Danemark (Scheutz *et al.*, 2001) et 47 % en Irlande (Derval, 2001). Les SHU, quant à eux, représentaient 4,5 % des infections à STEC en Allemagne (Beutin *et al.*, 1998), 7 % en Irlande (Derval, 2001) et 10 % en Écosse (MacDonald *et al.*, 1996).

Entre 85 et 99 % des SHU sont précédés d'une diarrhée (96 % en France), et entre 34 et 59 %, d'une diarrhée sanglante (59 % en France) (Elliott *et al.*, 2001; Gerber *et al.*, 2002; Haeghebaert *et al.*, 2003; Tozzi *et al.*, 2001).

La létalité consécutive à un SHU varie de moins de 1 à 6 % dans les séries de cas sporadiques ou lors d'épidémies. En France, depuis 1993, les données du réseau de surveillance montre une létalité inférieure à 1 % (0,72 %) (Haeghebaert *et al.*, 2002b). En Europe, la létalité varie de 1,4 % en Italie à 3 % en Allemagne et Autriche (Gerber *et al.*, 2002; Tozzi *et al.*, 2001) et peut atteindre 6 % chez les enfants de moins de 5 ans aux Etats-Unis (Griffin *et al.*, 2001).

Des infections asymptomatiques ont aussi été observées, mais leur fréquence reste encore mal connue (Tarr, 1995). Cependant, des données de surveillance des infections à STEC ont montré que 7 % des infections à STEC non-O157 en Allemagne (Beutin *et al.*, 1998) et 8 % des infections à *E. coli* O157 en Irlande (Derval, 2001) étaient asymptomatiques.

QUESTION N°12 : QUE SAIT-ON DES FLUCTUATIONS SAISONNIERES DES INFECTIONS A STEC ?

En France, depuis la mise en place de la surveillance des SHU en 1996, on observe surtout des cas sporadiques de SHU avec une recrudescence saisonnière pendant la période estivale (juin-septembre) (Haeghebaert *et al.*, 2002b).

Cette augmentation estivale est aussi observée dans d'autres pays européens : Angleterre et Pays de Galles (Bolton *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001b), Irlande (Derval, 2001), Écosse (MacDonald *et al.*, 1996), Danemark (Scheutz *et al.*, 2001), Belgique, Pays-bas et Allemagne (Van de Kar *et al.*, 1996), et en Amérique du Nord (Michel *et al.*, 1999).

QUESTION N°13 : QUELLES SONT LES MODES DE TRANSMISSION DES STEC A L'HOMME ?

Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins). Aux Etats-Unis, ces différents modes de transmission représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % (Griffin *et al.*, 2000).

1 Transmission alimentaire :

Le principal mode de transmission est la consommation d'aliments contaminés : (*se référer également aux* Tableau 2 et Tableau 3)

- produits carnés : principalement de la viande de bœuf (Chapman *et al.*, 1993b; Cowden, 1997; MacDonald *et al.*, 1988; Rodrigue *et al.*, 1995; Vaillant and Espié, 2002; Willshaw *et al.*, 1993), mais aussi des produits transformés à base de porc (Paton *et al.*, 1996; Tilden *et al.*, 1996) ou de la viande de cerf (Keene *et al.*, 1997; Rabatsky-Ehr *et al.*, 2002) ;
- lait et produits laitiers non pasteurisés (Allerberger *et al.*, 2001; Casenave *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993) ;
- légumes crus (salade, radis, etc) (Ackers *et al.*, 1998; Breuer *et al.*, 2001; Hilborn *et al.*, 1999; Infectious Agents Surveillance Center, 1996; Michino *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1988) ;
- cidre et jus de pommes non pasteurisés (Besser *et al.*, 1993; Cody *et al.*, 1999; Hilborn *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 1982).

La consommation d'aliments contaminés de manière croisée à partir de viande de bœuf hachée crue, notamment lorsque le personnel de cuisine ne se lavait pas les mains après avoir touché la viande, a aussi été décrite (Nataro and Kaper, 1998).

2 Transmission hydrique

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 (Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Akashi *et al.*, 1994; Dev *et al.*, 1991; Jones and Roworth, 1996; Licence *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2002; Swerdlow *et al.*, 1992). L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade dans un lac ou autre étendue d'eau (Ackman *et al.*, 1997; CDC, 1996; Cransberg *et al.*, 1996; Keene *et al.*, 1994; Paunio *et al.*, 1999) ou dans une piscine (Brewster *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1999; Hildebrand *et al.*, 1996), a elle aussi été incriminée.

3 Transmission inter-humaine

Une transmission de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant eu de la diarrhée, a été observée en milieu familial (CDSC, 2000b; Heuvelink *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1997; Vaillant and Espié, 2002) ou dans des collectivités : crèches (Al-Jader *et al.*, 1999; Allaby and Mayon-White, 1995; Belongia *et al.*, 1993; Boudailliez *et al.*, 1997; Swerdlow and Griffin, 1997), maisons de retraite ou institutions médico-sociales (Carter *et al.*, 1987; Griffin and Tauxe, 1991; Kohli *et al.*, 1994; Rowe *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1986).

4 Contact avec des animaux de ferme et leur environnement

La transmission d'infections à *E. coli* O157 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors d'investigations de cas isolés (Heuvelink *et al.*, 2002; Synge *et al.*, 1993), d'études de cas sporadiques (Beutin *et al.*, 2000; Coia, 1998; Kassenborgh *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2001a; Parry and Salmon, 1998; Renwick *et al.*, 1994; Trevena *et al.*, 1999) et lors d'épidémies (Crump *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 1999; Milne *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 1994).

5 Contamination de laboratoire

Des cas de contamination de laboratoire ont été décrits dans la littérature (Booth and Rowe, 1993; Burnens *et al.*, 1993).

QUESTION N°14 : QUE SAIT-ON DE L'INCIDENCE DES INFECTIONS A STEC EN FRANCE ? DE SON EVOLUTION AU COURS DE CES DERNIERES ANNEES ?

En France, aucune donnée sur l'incidence des infections à STEC n'est disponible. Cependant, l'incidence des SHU peut être utilisée comme indicateur des infections à STEC cohérent dans le temps (WHO, 1997) et si on admet que la proportion des personnes infectées par des STEC qui développent un SHU, est constante (5-10%), les données sur le nombre de cas de SHU peuvent permettre l'estimation du nombre réel d'infections à STEC (Ammon, 1997).

En 2001 en France, le taux d'incidence du SHU autochtone était de 0,67 pour 100 000 enfants de moins de 15 ans (soit 76 cas notifiés) et de 2,1 pour 100 000 enfants de moins de 2 ans. Ce taux d'incidence est resté stable depuis 1996 (< 1 pour 100 000). Les taux d'incidence les plus élevés ont été observés dans les régions françaises suivantes : Champagne-Ardennes ($2,2/10^5$), Bretagne ($1,5/10^5$), Midi-Pyrénées ($1,4/10^5$), et Alsace ($1,2/10^5$) (Haeghebaert *et al.*, 2003). Par ailleurs, depuis 1997, une recrudescence du nombre de cas de SHU a été observée dans le Finistère. Elle est caractérisée par une incidence départementale supérieure à l'incidence nationale, un regroupement temporo-spatial des cas dans le Nord-Ouest du département et une proportion de SHU liés à une infection à *E. coli* O157:H7 plus élevée dans le département que dans le reste de la France (Haeghebaert *et al.*, 2001).

QUESTION N°15 : QUE SAIT-ON DE L'INCIDENCE DES INFECTIONS A STEC DANS LES AUTRES PAYS ? DE SON EVOLUTION AU COURS DES DERNIERES ANNEES ?

Selon les pays, les infections à STEC sont surveillées soit directement, soit indirectement par la surveillance des SHU. Chaque pays possède un système de surveillance qui lui est propre (déclaration obligatoire de la maladie, réseau sentinelle de laboratoires, hôpitaux ou médecins) (Tableau 1) et qui dépend fortement des pratiques et critères de recherche des STEC ainsi que de l'exhaustivité du système de surveillance mis en place. Les incidences observées dans chaque pays ne sont donc pas comparables entre elles, sauf si les systèmes de surveillance sont similaires.

Tableau 1 : Systèmes de surveillance ou sources de données sur les infections à STEC ou des SHU dans les pays européens (année de mise en place) (Ammon, 1997; WHO, 1997).

	Infections à STEC			SHU		
	Déclaration obligatoire	Système sentinelle	Autres sources	Déclaration obligatoire	Système sentinelle	Autres sources
Allemagne	x (1998)			x (1998)		
Angleterre		x (1996)			x (1997)	
Autriche	x (1996)		x		x (1994)	
Belgique		x (1994)				x
Danemark			x			x
Ecosse		x (1984)			x (1997)	x
Espagne			x			x
Finlande	x (1994)	x (1996)				x
France					x (1996)	
Grèce			x			
Irlande			x		x (1997)	
Irlande du Nord		x (1988)			x (1997)	
Italie		x (1991)	x		x (1988)	
Norvège	x (1995)					
Pays-Bas		x (1996)	x			x
Pays de Galles		x (1987)			x (1997)	
Portugal						
Suède	x (1996)					
Suisse			x		x (1997)	
Etats-Unis		x (1992)			x (1997)	

1 Incidence des infections à STEC et du SHU en Europe

Les données de surveillance des infections à STEC (O157 et non-O157) de 10 pays européens ont montré qu'en 1996, l'incidence par million d'habitants variait entre 0,1 en Espagne et 20,3 au Royaume Uni (Ammon, 1997).

L'incidence des infections à STEC, en Europe continentale, est faible ($< 1/10^5$) (Tozzi and Fisher, 1999). En 2000, l'incidence des infections à STEC observée dans les pays nordiques était faible : Danemark 1,1 pour 10^5 habitants ; Finlande 0,4 pour 10^5 ; Suède 0,73 pour 10^5 (cas autochtones) ; Norvège 0,2 pour 10^5 (Anonyme, 2002a), alors que celles observées en Angleterre, Pays de Galles, Écosse et Irlande du Nord, étaient plus élevées, respectivement 1,7, 4,1 et 2,4 pour 10^5 habitants (Anonyme, 2001).

L'incidence annuelle du SHU pédiatrique, observée en Europe continentale, est de $1,9/10^5$ (Tozzi and Fisher, 1999). Cette incidence varie selon les pays, mais reste du même ordre de grandeur que celle observée en France : Italie (1988-2000) $0,26/10^5$ enfants de moins de 15 ans (Tozzi *et al.*, 2001) ; Danemark (1997-2000) $0,67/10^5$ enfants de moins de 5 ans (Scheutz *et al.*, 2001), Allemagne et Autriche (1997-2000) respectivement $0,71/10^5$ et $0,36/10^5$ enfants de moins de 15 ans (Gerber *et al.*, 2002).

2 Incidence des infections à STEC et du SHU dans les autres pays

Aux Etats-Unis en 1996, l'incidence annuelle des infections à STEC était de $0,29/10^5$ et variait de 0,6 à $5,5/10^5$ selon les Etats participant à la surveillance (Hedberg *et al.*, 1997). De 1997 à 1999, l'incidence

annuelle des SHU était de $1,4/10^5$ chez les enfants de moins de 5 ans et de $0,7/10^5$ chez les moins de 15 ans (Griffin *et al.*, 2001).

Au Canada, l'incidence des infections à STEC était de $3,0/10^5$ habitants en 1993 (WHO, 1997).

En Argentine, en 1999, l'incidence des SHU était de $9,2/10^5$ chez les enfants de moins de 5 ans (Miliwebsky *et al.*, 2000).

En Australie (1994-98), l'incidence annuelle des SHU était de $0,64/10^5$ chez les enfants de moins de 15 ans et de $1,35/10^5$ chez ceux de moins de 5 ans (Elliott *et al.*, 2001).

QUESTION N°16 : QU'EST CE QU'UNE EPIDEMIE D'INFECTIONS A STEC ? POURQUOI LES DETECTER ET REALISER DES INVESTIGATIONS ?

En France, une épidémie d'infections à STEC est suspectée en cas d'agrégat temporo-spatial de syndromes hémolytiques et urémiques, de diarrhées sanglantes ou de cas de diarrhée autour d'un cas de SHU. La détection d'épidémies repose sur la surveillance du SHU mise en place en 1996, avec les néphrologues pédiatres et sur la surveillance des Toxi-Infections Alimentaires Collectives, qui figurent dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (décret n°86-770 du 10 juin 1986)².

Une épidémie doit être détectée et soumise à investigation pour en mesurer l'importance, identifier l'origine, la source et le véhicule, et proposer des mesures de contrôle et de prévention adaptées. Vu la gravité des complications des infections à STEC, il est important de mettre en œuvre rapidement des mesures de gestion du risque et de limiter la survenue de nouveaux cas.

Un réseau de surveillance européen des salmonelloses humaines et des infections à STEC, « Enternet », a été mis en place en 1994. Il regroupe des microbiologistes des laboratoires de référence nationaux et des épidémiologistes des institutions nationales de santé publique de 15 pays de l'Union Européenne, auxquels s'ajoutent l'Australie, le Canada, la Norvège, le Japon, l'Afrique du Sud et la Suisse. Ce réseau de surveillance permet, par mise en commun de données nationales sur les STEC, de détecter l'émergence de phénomènes nouveaux et d'investiguer des épidémies affectant plusieurs pays (Reilly *et al.*, 2000).

QUESTION N°17 : QUEL EST LE SCHEMA ACTUEL D'UNE INVESTIGATION D'EPIDEMIE EN FRANCE ?

Lors de la survenue de plusieurs cas de SHU ou de plusieurs cas de diarrhées autour d'un cas de SHU, une alerte est déclenchée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Une investigation est immédiatement mise en œuvre (Figure 10).

Une évaluation préliminaire ou enquête exploratoire, ayant pour but de confirmer l'excès de cas (confirmation du diagnostic du/des cas, confirmation de l'épidémie) est réalisée. Une recherche active des cas de SHU et de diarrhée sanglante est ensuite effectuée, par les Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) et l'InVS, auprès des pédiatres, médecins généralistes, laboratoires d'analyses biomédicales et hôpitaux. Un recueil de données socio-démographiques, cliniques et épidémiologiques (expositions à risque) est réalisé auprès des cas identifiés à l'aide d'un questionnaire standardisé. Les informations ainsi collectées sont analysées afin d'identifier des éléments communs.

Lorsqu'une source est suspectée (aliment ou eau contaminés, lien avec une ferme...), une enquête vétérinaire est effectuée par les agents des Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV) afin de réaliser des prélèvements alimentaires, animaux ou environnementaux.

² TIAC : Maladie à déclaration obligatoire (décret n°86-770 du 10 juin 1986) une toxi-infection collective alimentaire est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Ces prélèvements sont transmis au Laboratoire d'Études et de Recherches en Hygiène et Qualité des Aliments (LERHQA) de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) ou dans un des laboratoires des Écoles Nationales Vétérinaires d'Alfort ou de Lyon, pour recherche de STEC (isolement et caractérisation des souches avec recherche de facteurs de virulence : Shiga-toxines, entérohémolysine et facteur d'attachement-effacement).

Si des souches de STEC sont isolées des prélèvements d'origine humaine et des prélèvements d'origine alimentaire ou environnementale, elles sont comparées entre elles par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) réalisé au CNR des *Escherichia coli* et *Shigella* (Unité Biodiversité des Bactéries pathogènes émergentes, Institut Pasteur-Paris).

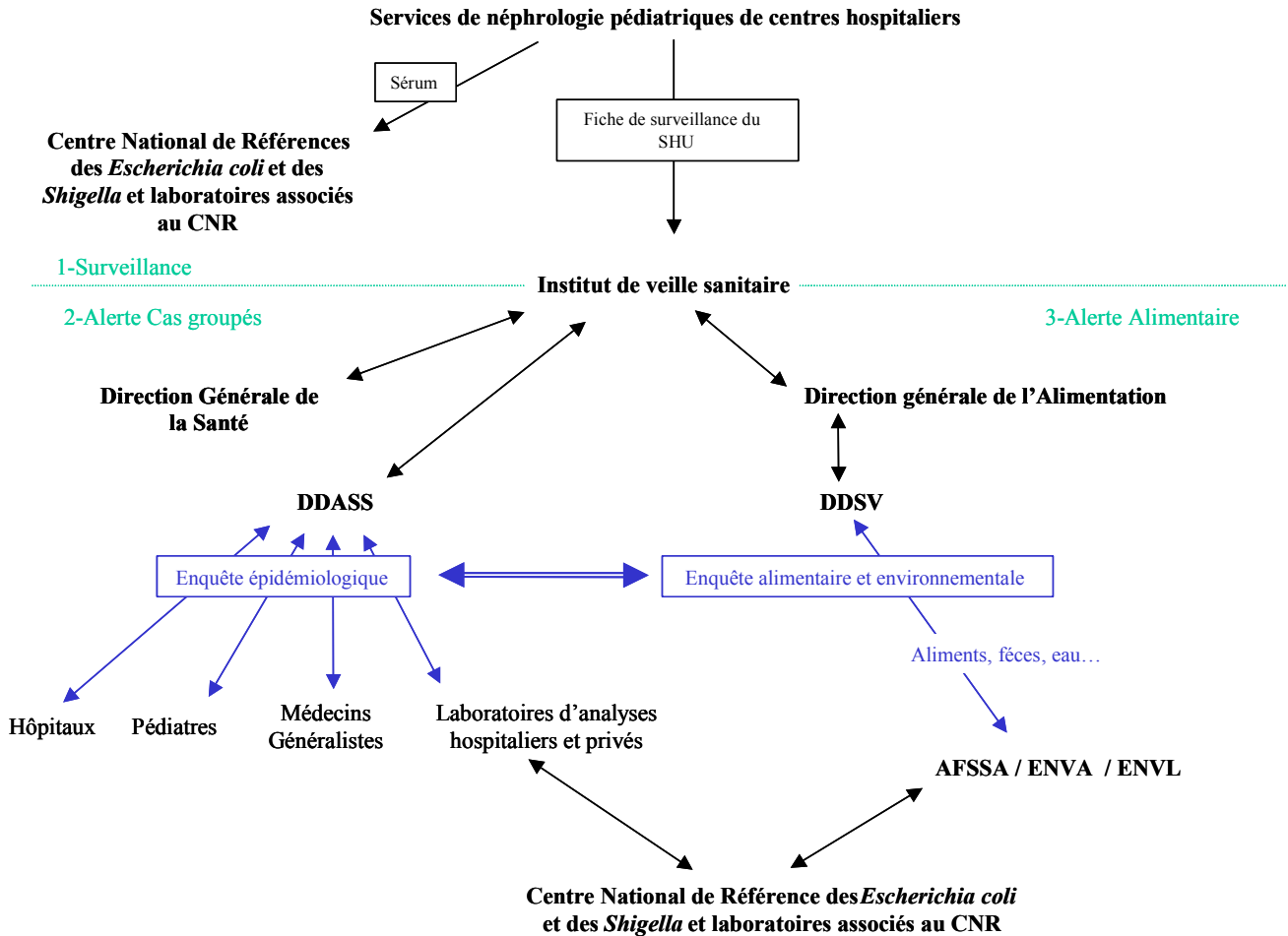


Figure 10 : Schéma actuel d'une investigation lors de cas groupés de SHU en France

QUESTION N°18 : QUELS SONT LES ALIMENTS MIS EN CAUSE LORS DES PRINCIPALES EPIDEMIES DECRITES?

Les aliments mis en cause lors d'épidémies ont des caractéristiques communes : aliments susceptibles d'être contaminés par des STEC, possédant des caractéristiques physico-chimiques permettant la survie des STEC et consommés sans avoir été suffisamment chauffés pour détruire les *E. coli*. Les aliments plus particulièrement à risque sont les denrées d'origine animale, qui sont directement liés au réservoir animal de STEC (voir Section E) et les produits qui peuvent être en contact direct ou indirect avec des fèces animales et consommés crus ou peu cuits.

1 En France

Les investigations de deux séries de cas groupés de SHU, en 1992-93 (4 cas sur 14 mois dans le Cher) et en 1994 (4 cas sur 6 mois dans l'Ardèche), avaient permis de suspecter respectivement du fromage frais au lait de chèvre et de vache (Casenave *et al.*, 1993) et du fromage de chèvre frais (Decludt, 1995). Récemment, deux épisodes de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) liée à des STEC ont été détectés et soumis à investigation :

- Une première TIAC liée à *E. coli* O157, a été détectée en décembre 2000. C'est l'enquête réalisée autour d'un cas de SHU notifié par le réseau de surveillance, qui a permis d'identifier 10 autres cas de diarrhées sanglantes chez des personnes présentes au même banquet. L'aliment suspecté a été le couscous servi lors du repas, et plus particulièrement des merguez peu cuites. Cette TIAC à *E. coli* O157 était la première TIAC liée à ce pathogène détectée en France (Haeghebaert *et al.*, 2002a).
- La deuxième TIAC liée à *E. coli* de sérotype O148:H8 est survenue en 2002, suite à un repas de mariage. Deux cas de SHU adultes et 9 cas de diarrhées (dont 4 cas de diarrhées sanglantes) ont été identifiés. L'origine de la contamination a été attribuée à la viande de mouton provenant d'un élevage familial (Espié and Vaillant, 2003).

Depuis la mise en place du système de surveillance en 1996, aucune épidémie communautaire n'a été détectée en France.

2 En Europe et Amérique du Nord

Les STEC ont une distribution mondiale, mais les épidémies liées à des infections à STEC ont surtout été rapportées dans les pays industrialisés de l'hémisphère Nord et de l'hémisphère Sud (Nataro and Kaper, 1998) (Figure 11).

Lors de ces principales épidémies survenues en Europe ou en Amérique du Nord, des produits carnés ou de charcuterie ont tout d'abord été mis en cause (21 fois), puis plus récemment des produits végétaux (11 fois) et des produits laitiers (11 fois) (Tableau 2).

La consommation d'eau de distribution contaminée a aussi été à l'origine d'épidémies (12 fois) (Tableau 3 et Section E-Question n°23).

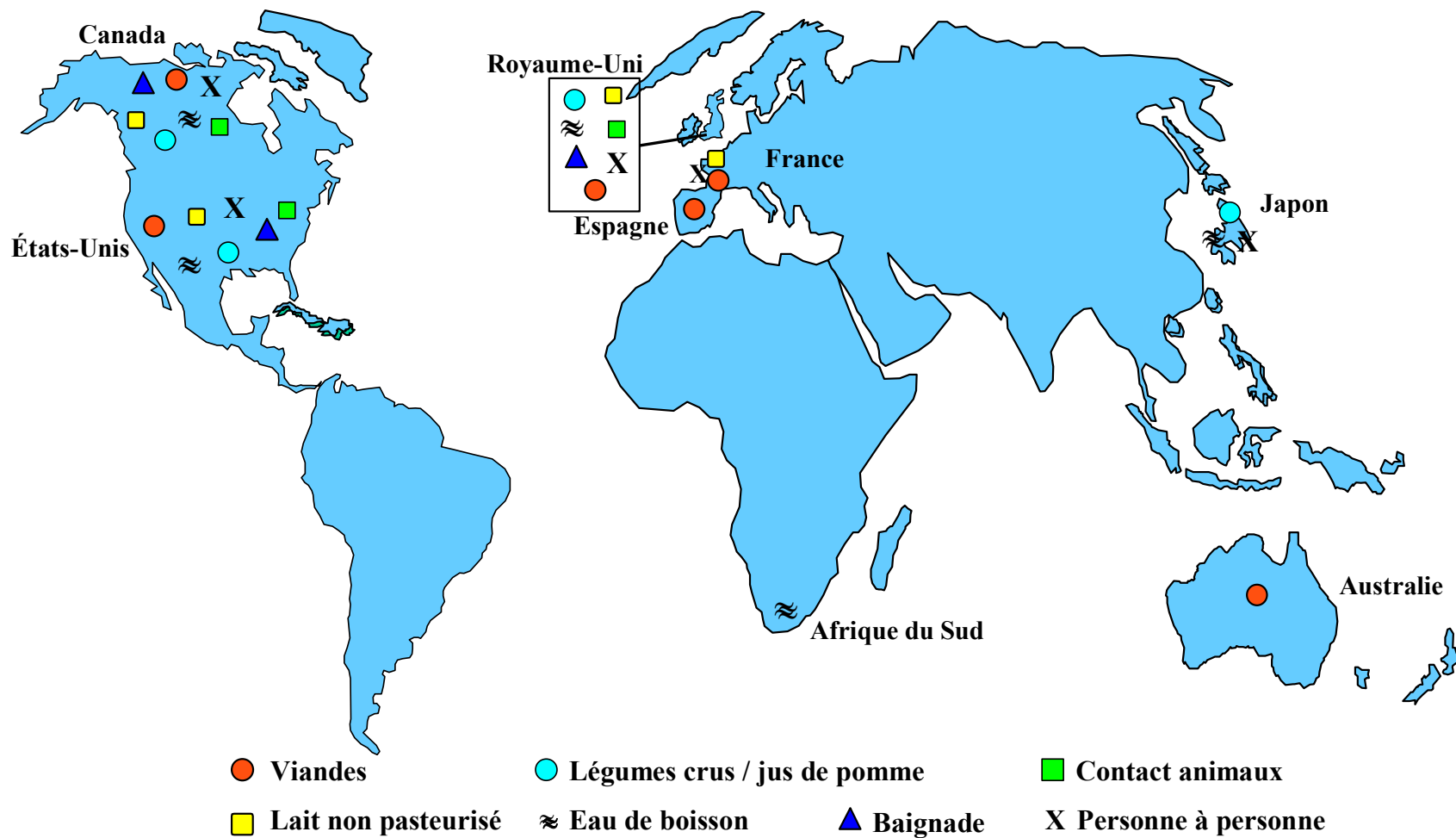


Figure 11 : Répartition géographique des épidémies d'infections à STEC dans le monde (avec les modes de transmissions identifiés)

Tableau 2 : Épidémies d'infections à STEC liées à la consommation d'aliments contaminés et recensées depuis 1982, classés en fonction des types d'aliment (produits carnés, produits laitiers, végétaux)

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nbre de cas de SHU + nbre de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Critères permettant de suspecter ou de confirmer l'aliment	Références
1982	Oregon-Michigan USA	O157 : H7	46	Sandwich avec viande de bœuf hachée	ED* EA	(Riley <i>et al.</i> , 1983)
1984	Nebraska USA	O157 : H7	34 (4 décès)	Hamburger	EA	(Ryan <i>et al.</i> , 1986)
1986	Washington USA	O157 : H7	37	Viande de bœuf hachée	EA	(Ostroff <i>et al.</i> , 1990)
1987	Utah USA	O157 : H7	51 (8 SHU et 4 décès)	Viande de bœuf hachée	EA	(Pavia <i>et al.</i> , 1990)
1988	Wisconsin USA	O157 : H7	61 (0 SHU et 0 décès)	Rôti de bœuf	M	(Rodrigue <i>et al.</i> , 1995)
1988	Minnesota USA	O157 : H7	32 (0 SHU)	Pâté de viande (en croûte)	EA	(Belongia <i>et al.</i> , 1991)
1990	Nord Dakota USA	O157 : H7	70 (2 SHU)	Rôti de bœuf	ED	(CDC, 1991)
1991	Canada	O157 : H7	152 (22 SHU et 2 décès)	Viande de caribou et de bœuf hachée	M	(Orr <i>et al.</i> , 1994)
1992-93	Washington USA	O157 : H7	501 (45 SHU et 3 décès)	Hamburger	M	(Bell <i>et al.</i> , 1994)
1992-93	4 états USA	O157 : H7	583 (41 SHU et 4 décès)	Hamburger	M	(CDC, 1993)
1993	Angleterre et Pays de Galle	O157	17	Hamburger	M	(Willshaw <i>et al.</i> , 1994)
1994	Washington-Californie USA	O157 : H7	23 (2 SHU)	Salami sec	EA M	(Tilden <i>et al.</i> , 1996)
1995	Australie	O111 : H-	23 SHU (1 décès)	Saucisse sèche fermentée	M	(Paton <i>et al.</i> , 1996)
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	Plats préparés, à base de viande crue (bœuf, porc)	EA	(Stevenson and Hanson, 1996)
1995	Oregon USA	O157 : H7	11	Viande de cerf	M	(Keene <i>et al.</i> , 1997)
1996	Écosse	O157 : H7	512 (34 SHU et 17 décès)	Viande de bœuf	M	(Cowden <i>et al.</i> , 2001)
1997	Colorado USA	O157 : H7	15 (0 SHU et 0 décès)	Hamburger + bœuf haché	M	(CDC, 1997)

*SHU : Syndrome hémolytique et urémique

ED (Epidémiologie Descriptive) : suspicion de l'aliment sur la base d'une description de la consommation alimentaire des malades

EA (Epidémiologie Analytique) : association statistiquement significative entre la consommation de l'aliment suspecté et le fait d'être malade

M (Microbiologique) : identification d'un STEC du même type chez les malades et dans l'aliment suspecté, détection de Shiga-toxines ou de gènes codant pour les Shiga-toxines dans l'aliment

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nbre de cas de SHU + nbre de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Critères permettant de suspecter ou de confirmer l'aliment	Références
1998	Ontario Canada	O157 : H7	39	Salami	EA* M	(Williams <i>et al.</i> , 2000)
1999	Manitoba Canada	O157 : H7	10	Viande de bœuf hachée	M	(Macdonald <i>et al.</i> , 2000)
2000	Espagne	O157 : H7	181 (6 SHU)	Saucisse	ED	(Martinez <i>et al.</i> , 2001)
2000	Minnesota USA	O157 ; H7	55 cas (4 SHU) 3 épidémies successives	Viande de bœuf hachée	EA M	(Proctor <i>et al.</i> , 2002; Smith <i>et al.</i> , 2002)
2001	France	O157	10 (1 SHU et 0 décès)	Couscous (avec merguez)	ED	(Haeghebaert <i>et al.</i> , 2002b)
2002	France	STEC O148:H8	11 (2 SHU et 0 décès)	Viande de mouton	ED M	(Espié and Vaillant, 2003)
2002	Colorado USA	O157H7	18 (2 SHU et 0 décès)	Viande de boeuf	ED M	(CDC, 2002)
1991	Angleterre	O157 : H7	16 (5 SHU)	Yaourt de production locale	EA	(Morgan <i>et al.</i> , 1993)
1992-93	France	?	4 SHU	Fromage au lait cru de vache et de chèvre	EA M	(Casenave <i>et al.</i> , 1993)
1993	Angleterre	O157	7	Lait cru	M	(Chapman <i>et al.</i> , 1993b)
1994	Montana USA	O104 : H21	18	Lait	EA	(CDC, 1995)
1994	Angleterre	O157 : H7	70 (9 SHU et 1 PTT)	Lait pasteurisé de production locale	EA M	(Upton and Coia, 1994)
1997	Écosse	O157 : H-	37	Gâteau à la crème (préparation maison)	EA	(O'Brien <i>et al.</i> , 2001b)
1998	Wisconsin USA	O157 : H7	55	Fromage frais caillé	M	(CDC, 2000)
1998	Angleterre	O157	7	Crème non pasteurisée de production locale	ED	(CDSC, 1998)
1999	Pays de Galles Angleterre	O157	28	Fromage à base de lait non pasteurisé	M	(CDSC, 1999)

*SHU : Syndrome hémolytique et urémique

ED (Epidémiologie Descriptive) : suspicion de l'aliment sur la base d'une description de la consommation alimentaire des malades

EA (Epidémiologie Analytique) : association statistiquement significative entre la consommation de l'aliment suspecté et le fait d'être malade

M (Microbiologique) : identification d'un STEC du même type chez les malades et dans l'aliment suspecté, détection de Shiga-toxines ou de gènes codant pour les Shiga-toxines dans l'aliment

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nbre de cas de SHU + nbre de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Critères permettant de suspecter ou de confirmer l'aliment	
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé	M*	(CDSC, 2000a)
2001	Colombie Britannique Canada	O157 : H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non pasteurisé	M	(McIntyre <i>et al.</i> , 2002)
1985	Angleterre	O157 : H7	24 (1 †)	Légumes : carotte, Pomme de terre	EA * <i>préparation des légumes</i>	(Morgan <i>et al.</i> , 1988)
1995	Ontario Canada	O157 : H7	21 (0 SHU)	Salade	EA	(Preston <i>et al.</i> , 1997)
1995	Montana USA	O157 : H7	> 70 (1 SHU)	Laitue	EA	(Ackers <i>et al.</i> , 1998)
1996	Japon	O157 : H7	9 451 (12 décès) (16 foyers de > 10 cas)	Radis blanc	ED EA	(Michino <i>et al.</i> , 1999)
1996	Connecticut-Illinois USA	O157 : H7	61	Laitue	EA	(Hilborn <i>et al.</i> , 1999)
1997	Michigan-Virginie USA	O157 : H7	108 (4 SHU et 0 décès)	Germes de luzerne	EA	(Breuer <i>et al.</i> , 2001)
1997	Angleterre, Finlande, Suède, Pays de Galle, Danemark	O157	14 (3 SHU)	Légumes crus	EA	(Pebody <i>et al.</i> , 1999)
1998	Californie USA	O157	8 (0 décès)	Graines germées	EA	(Mohle-Boetani <i>et al.</i> , 2001)
1980	Canada	<i>E. coli</i> O128-B12	14 SHU (1 décès)	Jus de pomme frais	ED	(Steele <i>et al.</i> , 1982)
1991	Massachusetts USA	O157 : H7	23 (5 SHU et 0 décès)	Jus de pomme	EA	(Besser <i>et al.</i> , 1993)
1996	Canada	O157 : H7	70 (14 SHU et 1 décès)	Jus de pomme non pasteurisé	M	(Cody <i>et al.</i> , 1999)
1996	Connecticut USA	O157 : H7	14 (3 SHU)	Jus de pomme frais, non pasteurisé	EA	(Hilborn <i>et al.</i> , 2000)
1998	Ontario Canada	O157 : H7	10 (0 SHU et 0 décès)	Jus de pomme non pasteurisé	ED M	(Tamblyn <i>et al.</i> , 1999)

*SHU : Syndrome hémolytique et urémique

ED (Epidémiologie Descriptive) : suspicion de l'aliment sur la base d'une description de la consommation alimentaire des malades

EA (Epidémiologie Analytique) : association statistiquement significative entre la consommation de l'aliment suspecté et le fait d'être malade

M (Microbiologique) : identification d'un STEC du même type chez les malades et dans l'aliment suspecté, détection de Shiga-toxines ou de gènes codant pour les Shiga-toxines dans l'aliment

Tableau 3 : Épidémies d'infections à STEC liées à la consommation d'eau de distribution contaminée et recensées depuis 1989

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nbre de cas de SHU + nbre de décès)	Source suspectée ou confirmée (circonstances)	Critères permettant de suspecter ou de confirmer l'aliment	Références
1989	Missouri USA	O157:H7	243 (2 SHU et 4 décès)	Eau du réseau de distribution (ruptures des canalisations)	EA*	(Swerdlow <i>et al.</i> , 1992)
1990	Japon	O157:H7	42 (14 SHU et 0 décès)	Eau du robinet et du réseau (origine de la contamination inconnue)	ED M	(Akashi <i>et al.</i> , 1994)
1990	Royaume Uni	O157: H7	4	Eau du réseau de distribution (contamination par du lisier bovin)	ED M	(Dev <i>et al.</i> , 1991)
1992	Swaziland	O157:NM	> 2500	Eau du réseau (contamination eaux de surfaces par des bovins et précipitations importantes)	ED M	(Effler <i>et al.</i> , 2001)
1998	Wyoming USA	O157:H7	157 (4 SHU)	Eau de distribution municipale (source souterraine non traitée)	EA	(Olsen <i>et al.</i> , 2002)
1999	New-York USA	O157:H7	116 (11 SHU et 2 décès)	Eau de puits profond	EA M	(CDC, 1999)
1999	Écosse	O157:H7	6	Eau de source privée, non traitée (présence de pâtures de moutons et cerfs)	ED M	(Licence <i>et al.</i> , 2001)
1999	Texas USA	O157:H7	22	Eau du réseau de distribution (déficiency du traitement de chloration)	ED	(Lee <i>et al.</i> , 2002b)
2000	Californie USA	O157:H7	5	Eau d'une crique (contamination fécale d'origine humaine et animale)	ED	(Lee <i>et al.</i> , 2002b)
2000	Ohio USA	O157:H7	29	Eau de surface (origine inconnue) (déficiency du réseau de distribution)	ED	(Lee <i>et al.</i> , 2002b)
2000	Ontario Canada	O157 : H7	> 2000 (26 SHU et 14 décès)	Eau du réseau d'aqueduc municipal (précipitations abondantes et contamination sols et eaux de surface)	EA M	(Anonyme, 2000)

★ SHU : Syndrome hémolytique et Urémique

ED (Epidémiologie Descriptive) : suspicion de l'aliment sur la base d'une description de la consommation alimentaire des malades

EA (Epidémiologie Analytique) : association statistiquement significative entre le consommation de l'aliment suspecté et le fait d'être malade

M (Microbiologique) : identification d'un STEC du même type chez les malades et dans l'aliment suspecté, détection de Shiga-toxines ou de gènes codant pour les Shiga-toxines dans l'aliment

QUESTION N°19 : QUELLES ONT ÉTÉ LES CIRCONSTANCES D'APPARITION ET D'ÉVOLUTION DES QUATRE ÉPIDÉMIES MAJEURES AYANT INFLUENCÉ L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À STEC ?

1 Premières épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7, Etats-Unis, 1982

Aux Etats-Unis, en 1982, deux épidémies de colites hémorragiques ont été rapportées dans 2 Etats distincts (Oregon et Michigan), à 3 mois d'intervalle. Les investigations épidémiologiques et microbiologiques mises en œuvre ont permis de recenser au moins 47 malades (26 dans l'Oregon et 21 dans le Michigan) et d'isoler une bactérie de sérotype rare, *E. coli* O157:H7. Parmi les malades, 35 (73 %) ont été hospitalisés, aucune complication, séquelle ou décès n'a été rapporté. L'enquête cas-témoins réalisée a montré que la survenue de la maladie était très fortement associée au fait d'avoir mangé dans un des restaurants appartenant à une chaîne de restauration rapide et d'avoir consommé au moins un des sandwiches contenant de la viande hachée de bœuf, des oignons et des cornichons. Des souches de *E. coli* O157:H7 ont été isolées chez des malades (9 cas/20) et sur un prélèvement de steak haché cru provenant d'un lot suspecté d'avoir été utilisé pour la préparation de hamburgers dans les restaurants incriminés. Le faible taux d'attaque observé lors de ces 2 épidémies suggérait un faible taux de contamination de la viande crue, une diminution de la contamination par la cuisson de la viande ou des facteurs de sensibilité d'hôtes encore inconnus. En 1982, ont donc été décrites, pour la première fois, des épidémies de colites hémorragiques dues à *E. coli* O157:H7 (Wells *et al.*, 1983) et associées à la consommation de sandwiches à base de viande hachée de bœuf (Riley *et al.*, 1983).

2 Épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 liée à de la viande de bœuf, Écosse, 1996

En Écosse, durant les mois de novembre et décembre 1996, une épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 a été détectée dans le centre du pays, principalement dans le Lanarkshire. Au total, 512 malades ont été identifiés, parmi lesquels 337 confirmés par un isolement de *E. coli* O157:H7 dans les selles. Trente-quatre cas ont développé un syndrome hémolytique et urémique. Au moins 49 personnes ont été hospitalisées et 17 sont décédées. Les investigations épidémiologiques (3 études de cohorte et 1 étude cas-témoins) et l'enquête de traçabilité sur l'origine des denrées alimentaires consommées par les malades, ont permis d'incriminer, comme source de l'épidémie, de la viande de bœuf et d'autres produits à base de viande provenant d'une même boucherie. Les souches de *E. coli* O157:H7 isolées chez les malades et celles isolées des prélèvements alimentaires présentaient les mêmes caractéristiques moléculaires (lysotype 2, Shiga-toxines de type 1 et 2) et n'étaient pas différenciables par électrophorèse en champ pulsé. Les mesures de contrôle prises à l'encontre de cette boucherie (retrait des denrées, fermeture de l'établissement) ont permis de faire décroître le nombre de cas et d'enrayer rapidement l'épidémie. Cette épidémie d'infections à STEC est la plus importante jamais rapportée au Royaume-Uni et le plus sérieux problème d'intoxication alimentaire survenu en Écosse depuis une épidémie de typhoïde due à des conserves de corned beef, en 1964 (Cowden and Christie, 1997; Cowden *et al.*, 2001; Dundas *et al.*, 2001; Liddell, 1997; Wood *et al.*, 2001).

3 Épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7, liée à des végétaux, Japon, 1996

Au Japon, entre mai et décembre 1996, une épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 a été rapportée (16 foyers de cas groupés), impliquant plus de 7000 personnes. Au total, 9451 cas ont été identifiés, dont au moins 129 confirmés. Douze décès ont été observés. Ces épidémies ont affecté plusieurs écoles élémentaires et crèches (9 épisodes ; 7 470 cas), des maisons de retraite (3 épisodes ; 123 cas), une société industrielle (1 épisode ; 47 cas) et un établissement de préparation de repas préemballés (1 épisode ; 191 cas). Les repas servis dans les écoles étaient les mêmes pour toutes les écoles et étaient préparés dans une seule et même cuisine centrale. L'étude de cohorte réalisée sur 47 000 enfants et l'enquête de traçabilité sur l'origine des denrées alimentaires consommées ont montré que l'infection était liée à la consommation de germes de radis blancs contaminés, peu cuits. Ces germes de radis blancs provenaient d'un seul producteur, mais aucune souche de *E. coli* O157:H7 n'a été mise en évidence parmi tous les prélèvements environnementaux réalisés chez celui-ci (eaux d'arrosage, engrais, graines et germes de radis). L'origine de la contamination des

germes de radis n'a donc pas été déterminée. Cette épidémie d'infections à STEC est la 1^{ère} épidémie soumise à investigation au Japon, liée à la consommation de germes de végétaux (Mermin and Griffin, 1999; Michino *et al.*, 1999).

4 Epidémie d'infections à *E. coli* O157:H7, liée à de l'eau de boisson, Canada, 2000

Au Canada, en mai 2000, une épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 a été décrite dans la ville de Walkerton (Ontario), située en zone d'élevage intensif de bovins. Plus de 2000 cas ont été identifiés parmi les 4600 habitants. Soixante-cinq patients ont été hospitalisés, 27 ont développé un SHU et 7 sont décédés. Les investigations épidémiologiques suggéraient que l'eau du réseau de distribution (réseau d'aqueduc municipal) était à l'origine de la survenue de l'infection. Les analyses microbiologiques des prélèvements d'eau de l'aqueduc et des 3 puits approvisionnant la ville ont montré une forte contamination bactérienne et la présence de *E. coli* O157:H7 dans l'aqueduc et l'un des puits. La contamination du puits était liée à l'épandage de fumier de bovins sur les terres d'une ferme située à proximité du puits incriminé. Les prélèvements réalisés dans cette ferme ont montré l'existence de souches de *E. coli* O157:H7 qui présentaient les mêmes caractéristiques en électrophorèse en champ pulsé que les souches d'origine humaine. L'ampleur de l'épidémie s'expliquait par un ensemble de circonstances inhabituelles incluant des pluies torrentielles qui ont entraîné des inondations et une contamination des sols et des eaux de surface par *E. coli* O157. Cette épidémie est la 1^{ère} épidémie à *E. coli* O157 de grande ampleur, liée à la consommation d'eau de boisson contaminée, documentée au Canada. Elle remet en question la sûreté des sources d'eau souterraine qui peuvent être contaminées par les eaux de surface, particulièrement en période d'inondation (Anonyme, 2000; McQuigge *et al.*, 2000; O'Connor, 2002).

QUESTION N°20 : QUELS SONT LES ALIMENTS MIS EN CAUSE PAR L'ETUDE SUR LES FACTEURS DE RISQUE DES INFECTIONS A STEC SPORADIQUES ?

1 En France

Une étude sur les facteurs de risque de survenue des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans a été conduite en France en 2000 et 2001 (Tableau 4). Cette étude a montré que la survenue de SHU liée à une infection à STEC était associée à la consommation de steak haché de bœuf peu cuit, avec un risque (Odd Ratio-OR) de 5,5 (Intervalle de confiance à 95 % = 1,4-21,8). Ce risque était plus élevé chez les enfants âgés de moins d'un an (OR = 8,7 ; IC95 % = 1,3-58,3) (Vaillant and Espié, 2002).

Une étude complémentaire à cette étude sur les facteurs de risque de survenue des SHU, est actuellement en cours, jusqu'en 2005. Elle est réalisée en collaboration entre l'InVS, l'Institut Pasteur, La Direction générale de l'alimentation, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments et l'École nationale vétérinaire d'Alfort. Elle concerne les cas de SHU pour lesquels une exposition à une ferme a été retrouvée (vie sur une exploitation agricole ou visite d'une ferme, contact direct avec des animaux de ferme, consommation de produits fermiers ou laitiers non pasteurisés). L'objectif de cette étude complémentaire est de quantifier l'importance de la source animale (et son environnement) dans la survenue de cas de SHU sporadiques et de mieux connaître les facteurs de risque spécifiques à l'élevage (Vaillant and Espié, 2002).

2 En Europe et Amérique du Nord

Des études sur les facteurs de risque des infections à STEC ont été conduites aux Etats-Unis (Kennedy *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 1988; Slutsker *et al.*, 1998), au Canada (Le Saux *et al.*, 1993), en Angleterre et Pays de Galles (Parry *et al.*, 1998) et en Belgique (Pierard *et al.*, 1999) (Tableau 4).

Une étude sur les facteurs de risque de survenue des SHU a aussi été conduite au Canada (Rowe *et al.*, 1993).

Tableau 4 : Facteurs de risque mis en évidence par les études de type « cas-témoins » sur la survenue d'infections à STEC, 1985-2001

Pays	Sérotype de STEC	Année	Nombre de cas/ Nombre de témoins	Facteurs de risque associés avec une infection à STEC	Référence
Etats-Unis	O157	1985-86	24* / 48	Consommation de viande de bœuf hachée crue	(MacDonald <i>et al.</i> , 1988)
Canada	O157	1990	110* / 220	Consommation de viande de bœuf hachée peu cuite	(Le Saux <i>et al.</i> , 1993)
Etats-Unis	O157	1990-92	73* / 142	Consommation de hamburger et de hot-dog	(Slutsker <i>et al.</i> , 1998)
Royaume Uni	O157	1994-96	85* / 142	Consommation de viande de bœuf : hamburger ou crue en tranche	(Parry <i>et al.</i> , 1998)
Etats-Unis	O157	1997-98	200* / 380	Consommation de viande de bœuf hachée crue	(Kassenborgh <i>et al.</i> , 1998)
Belgique	O157 + non O157	1995-96	37* / 69	Consommation de poisson	(Pierard <i>et al.</i> , 1999)
Etats-Unis	O157	1999-2000	326* / 591	Consommation de viande de bœuf peu cuit	(Kennedy <i>et al.</i> , 2002)
France	O157 + non O157	2000-01	105** / 196	Consommation de Steak haché de bœuf peu cuit	(Vaillant and Espié, 2002)

*Diarrhées

* SHU associés à des infections à STEC

QUESTION N°21 : QUELS SONT LES AUTRES FACTEURS DE RISQUE CONNUS DES INFECTIONS A STEC?

D'autres facteurs de risque ont été mis en évidence lors d'études analytiques (Tableau 5), lors d'études descriptives de cas sporadiques ou d'investigation d'épidémies (Tableau 6).

Les principaux facteurs de risque identifiés étaient la transmission inter-humaine et le contact avec des animaux de ferme, et plus particulièrement avec des bovins, réservoir connu de STEC (voir Section E).

En France, l'étude sur les facteurs de risque de survenue des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans a montré que la survenue de SHU lié à une infection à STEC était associée à l'existence de cas de diarrhée dans la collectivité fréquentée par l'enfant (OR = 5,7 ; IC95 % = 1,0-32,5) et à l'existence de cas de diarrhée dans la famille (OR = 3,7 ; IC95 % = 1,1-12,4) dans les 7 jours précédant ou suivant la date de survenue de la diarrhée de l'enfant (Vaillant and Espié, 2002).

Tableau 5 : Facteurs de risque associés à des infections à STEC (autres que alimentaires), mis en cause par des études analytiques, 1990-2001

Pays	Année	Sérogroupe de STEC	Nombre de cas (nombre de SHU) / Nombre de témoins	Facteurs associés à une infection à STEC ou un SHU	Référence
Canada	1990	O157	34 SHU/102	Transmission de personne à personne	(Rowe <i>et al.</i> , 1993)
Etats-Unis	1990-92	O157	73/142	Transmission de personne à personne	(Slutsker <i>et al.</i> , 1998)
France	1992-93	O111	26 (10 SHU)/62	Transmission de personne à personne	(Boudailliez <i>et al.</i> , 1997)
Royaume Uni	1994-96	O157	85/142	Contact avec des animaux de ferme Transmission de personne à personne	(Parry <i>et al.</i> , 1998)
Angleterre	1996-97	O157	369/511	Contact avec une exploitation agricole	(O'Brien <i>et al.</i> , 2001a)
Écosse	1996-99	O157	183/545	Contact avec des animaux de ferme ou leurs fèces	(Locking <i>et al.</i> , 2001)
Etats-Unis	1996-97	O157	200/380	Vie à la ferme ou visite d'une ferme	(Kassenborgh <i>et al.</i> , 1998)
Etats-Unis	1999-2000	O157	326/591	Contact avec des animaux de ferme ou leurs fèces	(Kennedy <i>et al.</i> , 2002)
Etats-Unis	2000	O157	51 (8 SHU)/92	Contact avec des animaux de ferme	(CDC, 2001)
France	2000-01	O157 + non O157	105 SHU/ 196	Existence de cas de diarrhée dans la famille ou dans la collectivité	(Vaillant and Espié, 2002)

Tableau 6 : Facteurs de risques associés à des infections à STEC (autres que alimentaires), mis en cause par des études de cas sporadiques ou des investigations d'épidémies*, 1989-2000

Pays	Année	Sérogroupe de STEC	Nombre de cas (nombre de SHU)	Facteurs associés à une infection à STEC ou un SHU	Référence
Angleterre	1997	O157	(3 SHU)	Contact avec des animaux de ferme (chèvre et vache)	(Milne <i>et al.</i> , 1999)
Angleterre	1994-97	O157	69 (4 SHU)	Contact avec des bovins	(Trevena <i>et al.</i> , 1999)
Etats-Unis	1994	O157	7 (4 SHU)	Contact avec des animaux de ferme	(Shukla <i>et al.</i> , 1994)
Ecosse	1992-93	O157	138	Contact avec des animaux de ferme ou leurs produits	(Coia <i>et al.</i> , 1998)
Allemagne	1996-98	O118	17 (2 SHU)	Environnement rural Contact avec des bovins	(Beutin <i>et al.</i> , 2000)
Canada	1986-94	O157	24	Contact direct avec des bovins	(Louie <i>et al.</i> , 1999)
Canada*	1991	O157	152 (22 SHU)	Transmission personne à personne	(Orr <i>et al.</i> , 1994)
Angleterre*	1992	O157	15 (3 SHU)	Transmission personne à personne	(Allaby and Mayon-White, 1995)
Etats-Unis*	2000	O157	51 (8 SHU)	Contact avec des veaux	(Crump <i>et al.</i> , 2002)

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

Propositions pour l'amélioration des connaissances et la prévention des infections à STEC chez l'homme, en France :

→ Améliorer les connaissances sur l'incidence des diarrhées dues à des STEC, et en particulier celles des diarrhées sanglantes, en :

-informant et sensibilisant les médecins généralistes, pédiatres, cliniciens à l'intérêt d'un diagnostic des STEC, lors de diarrhées sanglantes ou non ;

-développant la capacité diagnostique des laboratoires d'analyses biologiques et médicales (publics et privés) par mise à disposition de techniques de diagnostic appropriées ;

-améliorant le diagnostic de *E. coli* O157:H7 et développant des méthodes de diagnostic pour les STEC non O157 ;

- développant des outils d'expertise (méthodes directes, sérologie).

→ Caractériser la virulence des souches de STEC pathogènes pour l'homme.

→ Évaluer un schéma de prise en charge thérapeutique des infections à STEC afin de limiter leur évolution vers un SHU.

→ Développer des relations de partenariat entre les différentes structures pouvant être impliquées dans l'investigation de cas groupés d'infections à STEC par :

-la création d'un réseau d'experts ;

-une collaboration entre les laboratoires de recherche susceptibles de réaliser les analyses microbiologiques sur des prélèvements d'origine alimentaire, animale ou environnementale et le CNR (échanges de souches, standardisation des méthodes de recherche de STEC) ;

-des échanges et une mise en commun de données sur la surveillance des STEC chez l'homme, chez les animaux, dans l'environnement et dans les aliments ;

-un développement de méthodes de comparaisons des souches de STEC d'origine humaine et celles d'origine alimentaire, animale ou environnementale.

→ Développer une surveillance de *E. coli* O157 et des STEC tout au long des filières de production animale (de l'élevage à la filière de distribution).

→ Améliorer les connaissances de l'éco-épidémiologie des STEC (O157 et non-O157).

→ Développer et améliorer l'information du public (et surtout des personnes à risque) sur les facteurs de risques de survenue des infections à STEC par :

-une information du consommateur et du personnel de restauration, en matière de préparation et de consommation des aliments (surtout ceux issus de la filière bovine) ;

-une information sur les mesures d'hygiène à mettre en œuvre lors de contacts avec des animaux de ferme ou leur environnement (vie sur une exploitation, visite de fermes pédagogiques, « classes vertes »).

Section E : Epidémiologie Environnementale et Alimentaire des STEC

Responsable de section : H. Brugere

Rédacteurs : B. Andral – J. Bouvet - H. Brugere – E. Espié – V. Leclerc – S. Roze – C. Vernozy-Rozand

Personnalités consultées : B. Lombard – F. Gauchard – V. Lafarge – M. Mansotte

POINTS A RETENIR

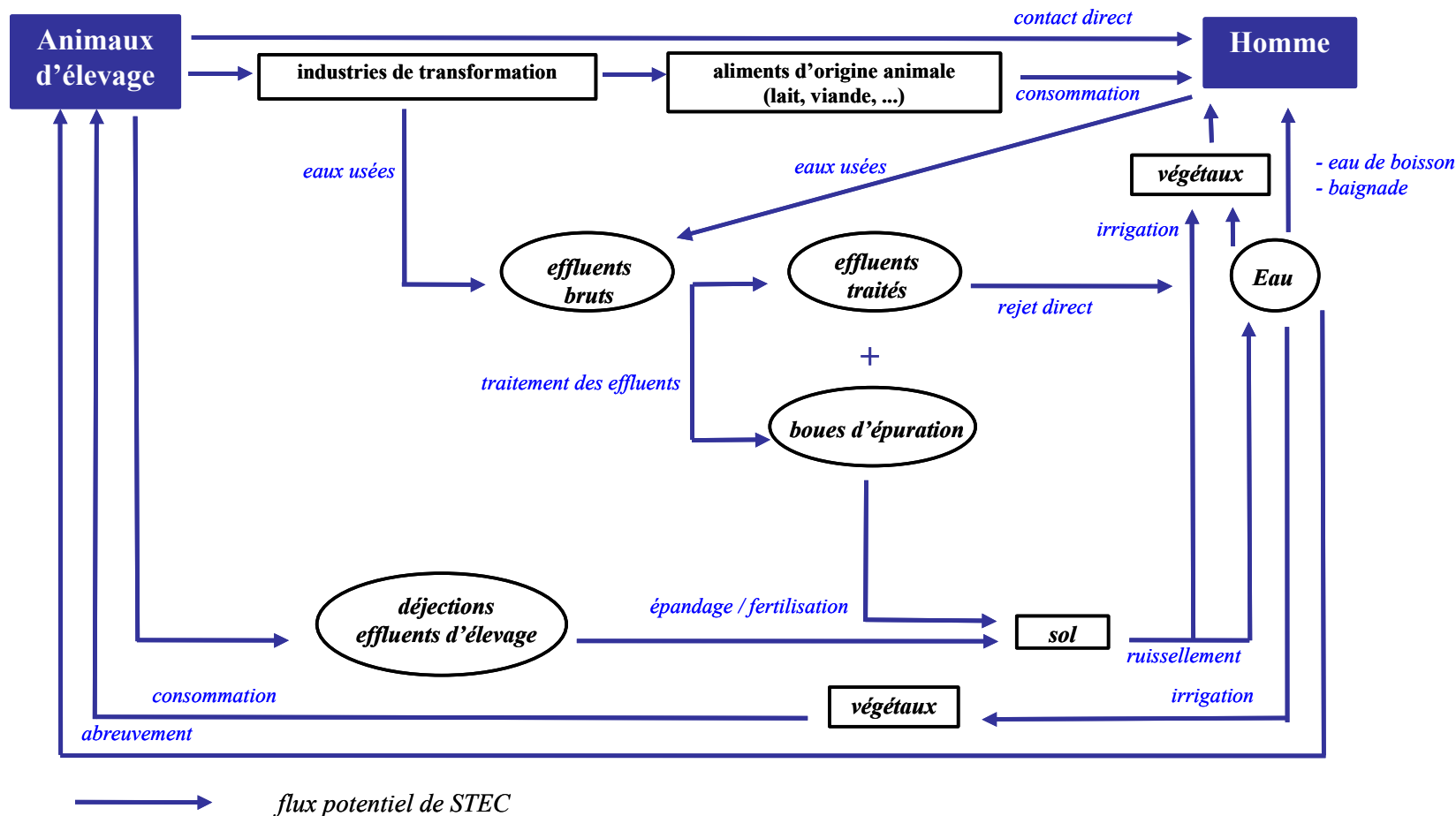
- Parmi les animaux, les bovins et les ovins sont les réservoirs principaux mais d'autres animaux d'élevage ou des animaux sauvages peuvent également être porteurs de STEC et ainsi participer à la contamination de l'environnement.
- Les études réalisées chez les bovins montrent que 20 à 80 % d'entre eux peuvent être porteurs de STEC (recherche des gènes *stx* dans les matières fécales), cependant *E. coli* O157:H7 n'est isolé que chez peu d'animaux (0 à 3 %) dans ces études.
- La persistance de souches de STEC dans les cheptels est due, d'une part, au portage intestinal par les animaux, et d'autre part, à la contamination des sols et des eaux à partir des déjections animales pouvant être à l'origine d'une contamination des aliments et de l'eau d'abreuvement des animaux.
- Les STEC semblent pouvoir survivre et rester infectieux pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (sédiments d'abreuvoir, fèces ou fumier sur le sol, ...).
- Des contaminations d'eau de surface, d'eau profonde et d'eau de réseau de distribution par *E. coli* O157:H7 ont été décrites lors d'épidémies. *E. coli* O157:H7 peut survivre dans l'eau pendant plusieurs jours à des températures inférieures à 8°C.
- Le risque de contamination des denrées d'origine animale est fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées notamment en abattoir et dans les ateliers de transformation.
- D'une manière générale, 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 bœuf sont contaminées par *E. coli* O157:H7 alors que jusqu'à 30 % des prélèvements étudiés peuvent être positifs pour la recherche des gènes *stx*).

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 (Figure 12).

Si le mode de transmission des infections à STEC reste principalement la transmission alimentaire, avec une diversité d'aliments identifiés comme véhicules (viande de bœuf, lait non pasteurisé...), plus récemment, des études d'épidémiologie analytique (O'Brien *et al.*, 2001a; Valcour *et al.*, 2002) et des investigations d'épidémies combinant des études microbiologiques et environnementales (Beutin *et al.*, 2000; Crump *et al.*, 2002; Lahti *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 1999) ont permis de décrire la transmission directe des STEC, des animaux et/ou de leur environnement à l'homme, offrant l'opportunité d'identifier des facteurs de risques spécifiques de l'infection (voir Section D-Question n°20 et 21).

Ces données ont été complétées par des études de prévalence de *E. coli* O157:H7 dans le réservoir animal, et plus particulièrement chez les ruminants, et par des études environnementales sur la présence et la survie prolongée de *E. coli* O157:H7 dans les fumiers, sols, eaux ...



1
 2 **Figure 12 : Flux potentiels de STEC** (H.Brugere-ENV de Toulouse).- Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent
 3 représenter les animaux d'élevage et l'homme. La transmission des STEC est possible :
 4 - soit par contact direct,
 5 - soit par la contamination d'aliments d'origine animale au cours de leur récolte ou de leur transformation,
 6 - soit à la suite d'une dissémination environnementale (lors de l'épandage de divers sous-produits ou déchets pour fertiliser les sols, lors du rejet d'effluents
 7 ou d'eaux usées dans le milieu extérieur)
 8 La présence et la survie des STEC dans l'environnement peut permettre la contamination de divers aliments de l'Homme ou des animaux, mais aussi de l'eau
 9 de boisson ou d'abreuvement.

QUESTION N°22 : QUE SAIT-ON DE LA PRESENCE DES STEC CHEZ LES ANIMAUX ?

1 Portage et excrétion de STEC par les ruminants d'élevage

1.1 Prévalence et excrétion de STEC par les ruminants d'élevage

Les données disponibles varient selon les auteurs et selon que l'on s'intéresse aux STEC dans leur ensemble ou à des sérotypes particuliers comme O157:H7.

En ce qui concerne les STEC, leur présence chez les ruminants est reconnue dans le monde entier et ne semble pas associée à des manifestations cliniques.

➤ Chez les bovins

Pour les bovins, cette présence est avérée par exemple sur les continents américains, aussi bien sur les animaux des filières viande (Cerqueira *et al.*, 1999; Schurman *et al.*, 2000; Thran *et al.*, 2001a) que sur les cheptels laitiers (Cerqueira *et al.*, 1999). Ainsi, des souches des sérogroupes O157, O6, O39 et O113 ont pu être bactériologiquement identifiées à partir de prélèvements fécaux de bovins à l'herbe aux Etats-Unis (Thran *et al.*, 2001b), avec des taux de prévalence variant de 4 % en été à 15 % en hiver. Au Brésil (Cerqueira *et al.*, 1999), la présence de gènes *stx* a été estimée dans une étude à 71 % des bovins testés (82 % chez les vaches laitières et 53 % en filière viande) avec isolement de *E. coli* O157:H7 pour 1,5 % des animaux.

En Australie, après analyse en PCR, 16,7 % des fèces de vaches laitières ont été trouvés porteurs de gènes *stx* (Cobbold and Desmarchelier, 2001; Cockerill *et al.*, 1996), avec mise en évidence des sérotypes O26:H11 et O157:H7 (1,7 % et 1,9 % des prélèvements respectivement), représentant 7,8 % et 9,4 % de l'ensemble des STEC mis en évidence.

Au Japon, une étude utilisant le screening *stx*-PCR (Kobayashi *et al.*, 2001) a montré une prévalence de 46 % pour les veaux, de 66% pour les génisses et de 69 % pour les vaches. Dans cette étude, 92 souches de *E. coli* isolées possédaient les gènes *stx*. Les sérogroupes mis en évidence ont été principalement O8, O26, O84, O113 et O116, deux souches appartenaient au séro groupe O111 et une au séro groupe O157. Les sérogroupes le plus fréquemment impliqués en pathologie humaine (O26, O111 et O157) ont été isolés dans 11,5 % des élevages (9 élevages sur 78 étudiés). Une autre étude utilisant la même méthodologie (Shinagawa *et al.*, 2000) a montré la présence de gènes *stx* sur les fèces de 39,4 % des veaux de moins de 2 mois, 78,9 % des jeunes bovins de 2 à 8 mois et 40,8 % des bovins adultes, mais une présence rare des sérogroupes impliqués en pathologie humaine.

En Inde, des travaux réalisés sur des bovins en milieu semi-urbain (Pal *et al.*, 1999) ont permis l'isolement de souches de STEC à partir de 10,5 % des animaux testés, tandis que 18 % de prélèvements fécaux et 50 % de prélèvements de viandes s'avéraient positifs pour la recherche de STEC (PCR sur *stx*₁ et *stx*₂) à l'abattoir (Khan *et al.*, 2002).

En Afrique (Ouganda), 45 prélèvements sur 159, provenant de matières fécales de zébus ont montré la présence de STEC de 16 sérogroupes O différents, sans toutefois mettre en évidence de sérotypes EHEC. Une seule souche possédait le gène *eae* (Kaddu-Mulindw *et al.*, 2001).

En Allemagne, des études ont été publiées dès 1993 concernant différentes espèces animales (Beutin *et al.*, 1993). Parmi les bovins testés, 21 % se sont avérés porteurs de STEC de différents sérogroupes non O157. Certaines des souches isolées à partir des bovins possédaient des gènes de virulence (*stx*, *ehxA*...). A l'occasion d'une autre étude s'étant étalée sur 6 mois en 1997, c'est 63,2 % des bovins testés qui étaient porteurs de STEC correspondant à 11 sérotypes (O116:H21 prédominant) et huit profil PGFE différents (Beutin *et al.*, 1997). La plupart des souches de STEC isolées étaient porteuses de *stx*₂ ou *stx*_{2c}.

Sur 122 souches de STEC *eae*⁺ isolées de veaux atteints de diarrhée en Allemagne et en Belgique (Wieler *et al.*, 1996), 87,7 % portaient le gène *stx*₁, 10,7 % le gène *stx*₂ et 1,6 % à la fois les gènes *stx*₁ et *stx*₂. Les principaux sérogroupes isolés étaient O5, O26, O111, O118, O145 et O157. Le séro groupe O118 était le séro groupe dominant avec 36 souches isolées. Toujours en Allemagne, au cours d'autres études, le séro groupe O118 semble le groupe dominant parmi les STEC isolés chez des veaux présentant de la diarrhée ; la très grande majorité des souches O118 étudiées (41 souches sur 42) avaient un fort potentiel pathogène avec la présence des gènes *stx*, *hly* et du LEE (Wieler *et al.*, 1998). La transmission zoonotique de souches du séro groupe O118 des bovins à l'homme a été mise en évidence (Beutin *et al.*, 2000). Au cours d'une étude dans 4 troupeaux de bovins en Allemagne, des souches de STEC du sérotype O26:H11 possédant l'ensemble des gènes de virulence *stx*₁ et/ou *stx*₂, *eae*, *ehxA*, *katP*, *espP*, ont été isolées d'animaux sains (Geue *et al.*, 2002).

En Espagne, en 1994, sur une période de 6 mois, des STEC étaient présents dans 84 % des troupeaux de bovins étudiés, avec une proportion d'animaux excréteurs par troupeau allant de 0 à 63 % (Blanco *et al.*, 1996). Des souches de STEC ont pu être isolées chez 20 % (52 sur 257) des vaches et 23 % (10 sur 71) des veaux étudiés. 7 sérogroupes dominants ont été identifiés, représentant au total 46 % des souches isolées : O8, O20, O22, O77, O113, O126 et O162. Une souche du sérotype O26:H11 et une du sérotype O157:H7 ont été isolées au cours de cette étude. La plupart des souches isolées chez les bovins ne possédaient pas le gène *eae*.

En France, une étude menée sur un an, a montré la présence des gènes *stx* sur 330 (70 %) de 471 prélèvements fécaux, 47 (11 %) parmi 411 prélèvements de muscle et 60 (10 %) parmi 603 prélèvements de fromages (Pradel *et al.*, 2000b). 34 % des prélèvements fécaux ont en outre permis l'isolement de souches de STEC, ainsi que 4 % et 1 % des prélèvements de muscle et de fromages respectivement. Sur les 210 souches STEC isolées, 9 (5 %) possédaient le gène *eae*. Les sérogroupes les plus fréquents étaient O174 (anciennement OX3), O113, O22, O91, O172 et O6. Une seule souche, isolée d'un bovin, appartenait au sérotype O157:H7.

Des études portent spécifiquement sur le sérotype O157:H7. Citons les rares résultats disponibles en France, pour lesquels les gènes *stx* sont présents sur 18 % des matières fécales et 10,7 % des carcasses de bovins étudiées, avec isolement de souches STEC sur 7,9 % des fèces et 1,9 % des carcasses (Rogerie *et al.*, 2001). Dans ce cadre, les rares souches de *E. coli* O157 isolées ne possédaient pas les gènes *stx*. Cependant, une enquête préliminaire réalisée sur des bovins en abattoir (Andral *et al.*, 1999a; Andral *et al.*, 1999b; Andral *et al.*, 2000) à partir de prélèvements auriculaires, a démontré la présence du sérotype O157 et en particulier du sérotype O157:H7. Parmi les souches O157, 15 % appartenaient au sérotype O157:H7 chez les bovins adultes étudiés : sur 85 bovins adultes testés grâce aux prélèvements d'oreilles, 21 étaient porteurs de *E. coli* O157, les souches de *E. coli* O157 possédant l'antigène flagellaire H7 étaient au nombre de 3 ; en ce qui concerne les veaux, le nombre de souches de *E. coli* O157 isolées était plus faible (4 souches sur 75 prélèvements), et une seule d'entre-elles possédant l'antigène flagellaire H7. Ces dernières souches étaient porteuses de gènes de virulence, *stx*₂, *eae*, *ehxA*. Leur sensibilité aux antibiotiques était beaucoup plus grande que celle de colibacilles isolés de cas de pathologies bovines (Tardy *et al.*, 2000). Aux Etats-Unis (Schroeder *et al.*, 2002), la sensibilité à différents antibiotiques a été étudiée pour 361 souches de *E. coli* O157 isolées entre 1985 et 2000 à partir de sources diverses : humains (131 souches), bovins (133 souches), porcins (70 souches), différents aliments (27 souches). 220 souches (61 %) du sérotype O157 étaient sensibles à tous les antibiotiques étudiés, mais 99 (27%) étaient résistantes à la tétracycline, 93 (26 %) au sulfaméthoxazole, 61 (17 %) à la céphalothine et 17 (24 %) à l'ampicilline. Le pourcentage de souches antibiorésistantes était plus important pour les souches O157 isolées chez le porc avec plus de 70 % de ces dernières résistantes au sulfaméthoxazole ou à la tétracycline. Cependant, seules 210 (58 %) des souches du sérotype O157 étudiées possédaient les gènes *stx*, la résistance de ces dernières aux antibiotiques est plus faible avec 21 souches (10 % des STEC) résistantes au sulfaméthoxazole et 19 (9 %) à la tétracycline. De même, 191 (53 %) des souches étudiées appartenaient au sérotype O157:H7, elles étaient toutes sensibles aux céphalosporines, à l'acide nalidixique et à la gentamicine et seules 19 souches (10% des *E. coli* O157:H7) étaient résistantes au sulfaméthoxazole et 16 (8 %) à la tétracycline.

Aux Etats-Unis, 0,28 % de 3570 prélèvements fécaux de vaches laitières, étaient porteurs de ce sérotype représentant 8,3 % des troupeaux laitiers étudiés, contre 0,71 % de fèces provenant de bovins à l'engraissement pour 16 % des troupeaux correspondants (Hancock *et al.*, 1994).

Meyer-Broseta *et al.* (2001) ont réalisé la synthèse de 26 études épidémiologiques réalisées aux Etats-Unis et en Europe. Pour les Etats-Unis, la prévalence des troupeaux positifs oscillait de 0-2 % jusqu'à 22 %, avec une moyenne de 7 à 8 % pour les troupeaux laitiers. Pour l'une des études réalisée sur des allotements d'animaux, avec un très grand nombre de prélèvements, une forte valeur de cette prévalence a été observée (61 %). Une seule enquête concernait des troupeaux à viande dans laquelle 4 des 25 cheptels étudiés se sont révélés positifs.

Deux études ont été réalisées sur un petit nombre de troupeaux, mais avec de nombreuses répétitions sur un an ; pour la première, 4 des 8 troupeaux étudiés se sont avérés porteurs, alors que pour la seconde, l'ensemble des 6 cheptels laitiers étudiés et des 6 allotements correspondants étaient positifs également (Hancock *et al.*, 1997b; Hancock *et al.*, 1998).

En Europe, et toujours dans le cadre de la synthèse de Meyer-Broseta *et al.* (2001), les valeurs notées pour la prévalence de *E. coli* O157:H7 sont beaucoup plus faibles, entre 0 et 3 %.

➤ Chez les ovins et les caprins

Le portage fécal en STEC, des moutons et des chèvres, a fait l'objet de nombreux travaux. Zschock *et al.* (2000) ont montré que respectivement 32,1 % des moutons et 75,3 % des chèvres étaient porteurs sains. Beutin *et al.* (1993) et Randall *et al.* (1997) confirment ces chiffres élevés : respectivement 66,6 % des moutons et 56,1 % des chèvres puis 63 % des moutons et 45 % des chèvres sont montrés excréteurs de STEC. Fegan et Desmarchelier (1999) montrent quant à eux que 45 % des moutons sont excréteurs de STEC : des fèces d'ovins provenant de 14 exploitations se sont avérées positives pour la recherche de STEC à 45 %, contre 36 % des fèces d'agneaux prélevées en abattoir ; 64 % des isolats contenaient les gènes *stx*₁ et *stx*₂

D'une manière générale, lors de ces études, le sérotype O157:H7 est rarement détecté. Selon Kudva *et al.* (1997a), le sérotype dominant serait O91:NM. Djordjevic *et al.* (2001) confirment ces résultats. Pour Zhang *et al.* (2002a), les sérotypes dominants seraient également O128:H2 et O146:H21.

La prévalence des souches *eae*⁺ est faible (Kudva *et al.*, 1997a; Zschock *et al.*, 2000). La majeure partie des souches est *stx*₁⁺, le gène *stx*₂ est rarement détectée (Beutin *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002a). Zhang *et al.* (2002a) considèrent qu'un nouveau variant *stx*_{1c} (anciennement nommé *stx*_{1Ox3} par Paton *et al.* (1995)) serait associé à l'origine ovine en raison de sa très grande fréquence dans cette espèce animale. Le pouvoir pathogène de ces souches STEC *stx*_{1c}⁺ et *eae*⁻ doit être considéré comme mineur, chez l'homme, selon ces auteurs.

En 2001, une étude portant ainsi sur 1623 fèces d'ovins, a révélé la présence de STEC porteurs de facteurs de virulence sur 85 % des agneaux et 95 % des moutons testés (Djordjevic *et al.*, 2001). Parmi les souches isolées, 47,5 % des STEC comportaient *stx*₁, *stx*₂ et *ehxA*. Parmi les six sérotypes cités dans ce travail, deux souches O157:H- ont été identifiées (2,2 % des isolats), mais les sérotypes prédominants de cette étude sont également ceux reconnus comme associés à des cas humains cliniques. Concernant les sous-types de *stx*₂, les ovins australiens semblent particulièrement souvent porteurs du sous-type *stx*_{2d}, proposé comme marqueur épidémiologique pour identifier l'origine des cas cliniques humains (Ramachandran *et al.*, 2001).

En Allemagne, un troupeau ovin de 25 têtes, a fait l'objet d'investigations, sur une période de 6 mois (Beutin *et al.*, 1997). 88 % des ovins excrétaient des STEC correspondant à 17 sérotypes et 12 profils PGFE différents. Là encore, la plupart des souches isolées ont révélé la présence des toxines Stx1 et Stx2.

Notons, que contrairement à ce qui a été décrit chez d'autres agents pathogènes (*Salmonella* sp., *Streptococcus* sp.), les STEC isolés chez l'animal ne montrent pas de résistance particulière aux antibiotiques (Schroeder *et al.*, 2002).

1.2 Persistance du portage et quantité de STEC excrétée par les ruminants d'élevage

Une étude américaine a consisté en l'inoculation de différents pathotypes de *E. coli* (dont des STEC de sérotype O157:H7) à des ovins afin d'évaluer la persistance de la colonisation (Cornick *et al.*, 2000a). Le résultat tend à montrer que les souches de STEC sont capables de persister plus longtemps *post* inoculation (2 mois et 2 semaines) que les autres pathotypes. Les auteurs concluent à une certaine adaptation des STEC pour persister dans le tractus digestif des ovins.

Aux Etats-Unis encore, la surveillance du portage de STEC dans un troupeau de bovins de races à viande, engraisés sur des pâtures irriguées, a montré la présence de ces bactéries à différentes saisons, avec des taux de prévalence de 4 % au printemps et de 15 % en hiver (Thran *et al.*, 2001a).

Au Japon, lors d'infections naturelles, l'étude des sérotypes de STEC isolés animal par animal a montré la capacité de ceux-ci à réapparaître sur le même ovin à 4 mois d'intervalle (Asakura *et al.*, 1998).

Concernant *E. coli* O157:H7, la synthèse de Meyer-Broseta *et al.* (2001) montre qu'aux Etats-Unis, la prévalence est de moins de 1,5 % sur des bovins de moins de 8 semaines, âge du sevrage (USDA-APHIS, 1994; Zhao *et al.*, 1995). Entre 8 semaines et 4 mois, elle augmente de 1,8 à 5 % (Faith *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1995). Ensuite, la prévalence décroît avec l'âge, comme cela a été montré par exemple par une étude sur des génisses âgées de 4 à 24 mois grâce à des prélèvements mensuels montrant une prévalence moyenne de 2,3 % (Hancock *et al.*, 1998). Les bovins adultes laitiers ou à viande excrètent *E. coli* O157:H7 avec une plus faible fréquence, inférieure à 0,7 %. Le taux de *E. coli* O157:H7 excrété varie entre 10³ et 10⁵ ufc/g de fèces de veaux (Zhao *et al.*, 1995).

En Europe, la synthèse de Meyer-Broseta *et al.* (2001) relève des observations comparables, avec une plus grande prévalence de *E. coli* O157:H7 sur les jeunes. Par ailleurs, elle souligne l'étude de Heuvelink *et al.* (1998c) aux Pays Bas qui montre une prévalence élevée (12 %) sur des troupeaux correspondant à des prélèvements positifs en abattoir, et beaucoup plus faible (1 %) sur des troupeaux dont les animaux n'ont jamais été trouvés porteurs en abattoir, soulignant ainsi, comme Andral *et al.* (1999a) en France, l'intérêt des prélèvements répétitifs sur la chaîne d'abattage.

Lors d'une étude de l'excrétion fécale de souches de *E. coli* O157:H7 chez les bovins réalisée aux Etats-Unis, des niveaux d'excrétion faibles sont décrits dans de nombreux troupeaux, mais des variations brutales du taux d'excrétion sont possibles (Besser *et al.*, 1997). Il semble y avoir des variations saisonnières avec un taux d'excrétion plus important en été qu'en hiver. D'une manière générale l'excrétion chez les animaux est transitoire et voisine d'un mois.

Chez le mouton, au contraire, l'excrétion semble plus faible pour la période allant de juin à octobre (Chapman *et al.*, 1996).

Une étude de l'excrétion fécale de souches de *E. coli* O157:H7 chez des génisses, dans un élevage en Italie, entre 1996 et 1997, montre que la bactérie est retrouvée dans les litières, dans le lisier et dans les abreuvoirs (Conedera *et al.*, 2001).

Certaines souches peuvent persister pendant plusieurs années dans un même troupeau, ce qui pourrait être en faveur du rôle de réservoir joué par les bovins. Cependant, l'introduction régulière des bactéries dans le cheptel, par les aliments et l'eau de boisson des animaux ne peut pas être complètement écartée (Hancock *et al.*, 2001).

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. La quantité de *E. coli* O157:H7 dans les fèces varie alors entre 2.10^2 et $8,7.10^4$ ufc/g de matière fécale. *E. coli* O157:H7 est retrouvé chez d'autres animaux, des mouches, un pigeon, mais aussi dans des prélèvements de nourriture et dans l'eau de boisson des animaux à une concentration allant de moins de 1 à 23 ufc/mL. 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.

Une étude réalisée en Alberta (Canada) sur des bovins à l'engraissement, a permis d'isoler des souches de *E. coli* O157 dans 0,8 % des prélèvements de fèces, 1,7 % des prélèvements réalisés dans les mangeoires et 4,5 % des prélèvements d'eau d'abreuvement des animaux (Van Donkersgoed *et al.*, 2001). Une corrélation positive est notée entre la température extérieure, la pluviométrie et la présence de *E. coli* O157. De même il y a une corrélation positive entre le nombre de coliformes ou de *E. coli* dans les prélèvements et la présence de *E. coli* O157.

Une enquête réalisée sur des jeunes bovins à l'engraissement, dans l'Ouest des Etats-Unis, en 1999 montre l'excrétion de *E. coli* O157:H7 chez 23 % des animaux testés, avec une excrétion plus importante quand les conditions d'hébergement des animaux ne sont pas satisfaisantes avec en particulier un sol humide et une accumulation de boue et de bouses (Smith *et al.*, 2001a).

Une étude menée en Suède dans un élevage de bovins laitiers impliqué dans la survenue d'un cas humain d'infection à STEC a montré que chez les veaux porteurs et excréteurs de *E. coli* O157:H7 au printemps, seuls ceux gardés à l'étable pendant l'été excrétaient encore la bactérie sur une période d'étude de 4 mois, alors que *E. coli* O157:H7 n'était jamais retrouvé dans les matières fécales des animaux au pré sur cette même période (Jonsson *et al.*, 2001). Il faut noter que les animaux gardés à l'étable étaient plus jeunes que ceux mis au pré, et d'autres auteurs ont montré une prévalence plus importante de *E. coli* O157:H7 dans les fèces des animaux jeunes (Cray and Moon, 1995; Heuvelink *et al.*, 1998c; Mechie *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1992). Parmi les hypothèses avancées pour expliquer la persistance de l'excrétion chez les veaux gardés à l'étable, une réinfection régulière des veaux par transmission entre animaux est suggérée.

Garber *et al.* (1999) montrent l'influence de la méthode de nettoyage des aires de stabulation et d'attente des animaux : par exemple, l'utilisation du jet d'eau pour leur lavage est associée à une prévalence plus importante de *E. coli* O157 dans le troupeau, par rapport à leur raclage à sec.

1.3 Influence du mode d'abreuvement des animaux ou de leur alimentation sur le portage et l'excrétion

Les études concernant l'influence de l'alimentation animale sur la présence des STEC en élevage concernent essentiellement les bovins.

➤ Abreuvement

Les abreuvoirs destinés au bétail sont une source potentielle de contamination et de re-contamination des animaux (Faith *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1998; Shere *et al.*, 1998; Van Donkersgoed *et al.*, 2001).

Des essais ont été réalisés pour mimer la survie des *E. coli* O157 dans le microcosme sédimenteux d'un réservoir d'eau pour animaux (Hancock *et al.*, 2001; LeJeune *et al.*, 2001a). Les *E. coli* O157:H7 présents à $9 \cdot 10^9$ ufc/g dans un mélange « sédiments et fèces » ont survécu pendant au moins 245 jours. Ces essais présentent l'avantage d'avoir été réalisés à partir d'une souche retrouvée dans les fèces et utilisée dans un microcosme aqueux non traité (présence d'une flore annexe) et non stagnant utilisé en conditions réelles (en extérieur d'avril à décembre). Ces auteurs ont également pu montrer que les souches de *E. coli* O157 ayant pu survivre plus de 6 mois étaient toujours infectieuses pour des veaux âgés de 10 semaines qui par la suite excrétaient eux-même des *E. coli* O157. De plus, tous les isolats ont été caractérisés (PGFE) et les profils retrouvés étaient très semblables voire identiques à celui de la souche de départ. Cette absence de variation importante dans les profils retrouvés démontre la persistance de la souche initiale pendant au moins 8 mois.

Une autre étude évoque la possibilité de prolifération bactérienne dans les sédiments des abreuvoirs (LeJeune *et al.*, 2001b) à une température de 20°C. De plus, les abreuvoirs pour lesquels le plus fort taux de *E. coli* est dénombré semblent présenter le plus de risque d'isoler *E. coli* O157. Le lien est montré entre la présence et l'activité phagocytaire des protozoaires dans le milieu et les résultats de dénombrements de *E. coli* : l'addition d'un inhibiteur des protozoaires, le cycloheximide, dans le milieu permet de dénombrer des taux plus importants de *E. coli*.

Une étude montre que, dans des conditions d'infection naturelle de veaux, la contamination d'animal à animal est possible et que l'eau de boisson peut être un vecteur de *E. coli* O157:H7 (Shere *et al.*, 2002). Le déplacement d'abreuvoir entre la loge d'un veau excréteur de la bactérie et celle d'un de ses congénères semble à l'origine de la contamination de ce dernier et de l'excrétion de *E. coli* O157:H7, et ce, bien qu'il n'ait pas été possible de mettre en évidence la présence de la bactérie dans un prélèvement de 100 mL de l'eau de l'abreuvoir déplacé. Dans des conditions d'infection expérimentale, la consommation d'eau de boisson contaminée par *E. coli* O157:H7 à raison de 10^3 ufc/mL permet l'excrétion de la bactérie dans les matières fécales des veaux.

➤ Alimentation et ensilage

Les différentes études menées ne permettent pas de mettre en évidence une relation univoque entre l'alimentation des animaux et l'excrétion de STEC.

Aux Etats-Unis, les conclusions semblent aller dans le sens d'une plus grande acido-résistance des *E. coli* excrétés dans les fèces chez les bovins nourris avec des céréales, par opposition à ceux ayant une alimentation fourragère (Couzin, 1998; Diez-Gonzalez *et al.*, 1998).

Cependant, des variations ont été notées en Australie sur des lots en engraissement avec une diminution de la prévalence des STEC lors du passage de l'alimentation en prairie aux céréales (Midgley and Desmarchelier, 2001).

En Australie encore, les travaux réalisés présentent des résultats parfois contradictoires avec les précédents. Dans certains cas (Cobbold and Desmarchelier, 2000), les veaux au sevrage sont décrits comme étant les principaux réservoirs de STEC dans les exploitations laitières, alors que pour des animaux à l'engrais, les fluctuations observées concernant l'excrétion de ces bactéries ne semblent pas liées aux changements alimentaires (Midgley *et al.*, 1999).

D'autre part, dans une étude menée en Suède (Jonsson *et al.*, 2001) deux groupes de veaux porteurs et excréteurs de *E. coli* O157:H7 avaient une alimentation différente : alors que la bactérie n'était plus retrouvée dans les matières fécales des veaux mis au pré et consommant de l'herbe, ceux gardés à l'étable pendant l'été et consommant un aliment concentré à base de céréales ont continué à excréter la bactérie. L'alimentation à base de céréales, entraînant une acidification du contenu digestif, pourrait favoriser l'excrétion de *E. coli* O157:H7. Cette hypothèse est proposée par d'autres auteurs (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998), mais, au contraire, Hancock *et al.* (1994) ne montrent pas de différence dans l'excrétion de *E. coli* O157:H7 entre des bovins nourris avec du foin ou avec des céréales.

Des travaux concernant l'évaluation du régime alimentaire ont également été réalisés sur des brebis d'un an artificiellement inoculées (Kudva *et al.*, 1997b). Dans ces conditions, il est observé que lorsque les brebis sont nourries avec du foin (pauvre en protéines, faiblement énergétique et riche en fibres), la concentration de *E. coli* O157:H7 excrétés est plus importante que lorsque les brebis sont nourries avec un mélange de blé et de luzerne (riche en protéines, énergétique et pauvre en fibres). Quant à la durée d'excrétion, elle est deux fois plus longue pour le régime à base de foin.

L'ensilage peut également jouer un rôle important en terme de survie des *E. coli* O157. Des travaux suggèrent que la contamination de l'herbe par des fèces d'animaux couplée à de mauvaises conditions d'ensilage peuvent favoriser la persistance des *E. coli* O157 chez les ruminants. Une étude réalisée sur des ensilages artificiellement contaminés à un niveau de 10^3 ufc/g a permis de mettre en avant la croissance des *E. coli* O157 dans de mauvaises conditions de stockage (Fenlon and Wilson, 2000). Les échantillons analysés ont été préparés dans des sacs plastiques et incubés à 20°C. En conditions d'aérobiose et en 1 semaine, le nombre de *E. coli* O157 est passé de 10^3 à 10^7 ufc/g. Cette tendance à l'augmentation du nombre de pathogènes, similaire pour les échantillons faiblement fermentés, s'inverse légèrement au fur et à mesure que le pH s'abaisse.

La présence de *E. coli* O157 (contamination artificielle à environ 3.10^3 ufc/g) sur de l'herbe ensilée dans des conditions qui permettent une dégradation aérobie et incubée à 20°C peut favoriser la multiplication de ces *E. coli* O157 jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10^9 ufc/g (Fenlon *et al.*, 2000).

Une autre étude montre que l'inoculation d'une souche permettant la production de lactate et la diminution du pH durant l'ensilage semble accélérer l'élimination des *E. coli* O157 (Bach *et al.*, 2002). Dans les conditions testées, les *E. coli* O157:H7 ne sont plus détectables après 7 jours. Dans des conditions identiques mais en absence de ces souches productrices de lactate, les *E. coli* O157:H7 ont été détectés jusqu'à une période de 15 jours.

2 Portage et excrétion par les autres animaux d'élevage et les animaux familiers

Les bovins et les ovins sont les principaux réservoirs mais d'autres animaux d'élevage ou des animaux sauvages peuvent également être porteurs de *E. coli* O157 et ainsi participer à la contamination de l'environnement.

Les porcs, les chiens et les chats –avec pour ces animaux des questions concernant l'éventualité d'une pathologie associée (Beutin, 1999)– sont cités comme étant susceptibles d'héberger des STEC (Beutin *et al.*, 1993) ainsi que les chevaux (Chapman *et al.*, 2000a; Chart, 1998).

Dans une étude concernant 12 fermes américaines, des *E. coli* O157 ont été retrouvés dans 1,1 % (n=90) des fèces de chevaux, dans 3,1 % (n=65) des fèces de chiens, dans 0,5 % (n=200) des oiseaux et dans 3,3 % (n=60) des mouches. Au contraire, aucun *E. coli* O157 n'a été retrouvé chez les rongeurs (n=300), chez les chats (n=33) ou chez divers animaux sauvages (n=34) (Hancock *et al.*, 1998).

Chez le porc, dans l'ensemble des études menées sur le portage fécal, la prévalence de O157:H7 était nulle (Chapman *et al.*, 1997; Parma *et al.*, 2000) ou inférieure à 2 % (Heuvelink *et al.*, 1999b; Nakazawa and Akiba, 1999). Cependant, malgré une prévalence très faible, les souches isolées pourraient être pathogènes pour l'homme au vu de leurs facteurs de virulence (*stx*₁⁺, *stx*₂⁺, *eae*⁺, *ehxA*⁺). De plus, au Japon, la prévalence de 1,4 % trouvée chez le porc était identique à celle observée chez le bétail. Au Chili, Rios *et al.* (1999) ont constaté que certaines souches isolées chez des malades et chez le porc étaient identiques : le porc pourrait représenter un réservoir important de *E. coli* O157:H7 pathogènes pour l'homme dans ce pays. En France, la seule étude menée sur le portage fécal en O157:H7 n'a pas permis la détection de ce sérotype parmi les 182 échantillons testés (Bouvet *et al.*, 2002a).

La prévalence des autres STEC dans les fèces varie de 0 % à 10 % selon les pays et les méthodes de détection (PCR, hybridation ou détection de l'effet cytotoxique des vérotoxines) (Beutin *et al.*, 1993; Caprioli *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 2001; Parma *et al.*, 2000; Suthienkul *et al.*, 1990).

Deux études ont donné des résultats supérieurs : 21 % pour 129 porcs en Australie (Sidjabat-Tambunan and Bensink, 1997) et 31 % pour 182 porcs en France (Bouvet *et al.*, 2002a) ; cependant, les auteurs n'ont pas toujours pu isoler de souches à partir des échantillons détectés positifs par PCR (0 % pour l'Australie et 34 % pour la France).

Concernant la présence de STEC dans les élevages de volailles, il existe très peu d'enquêtes permettant de préciser la prévalence de ce pathogène. On sait, d'après Beery *et al.* (1985) que *E. coli* O157:H7 peut coloniser le cæcum des poulets et s'y développer. L'inoculation artificielle entraîne une large colonisation du cæcum et une excrétion importante. Les auteurs concluent que la volaille peut être un réservoir du pathogène.

Beutin *et al.* (1993), dans le cadre d'une enquête portant sur plus de 700 prélèvements réalisés sur des animaux en bonne santé de différentes espèces, n'a pas montré de contamination des poulets par des STEC.

Aux Pays-Bas, des examens de matières fécales fraîches prélevées en élevage de poulets et de dindes ont été réalisés pour la recherche de *E. coli* O157 vérotoxiques (Heuvelink *et al.*, 1999b). L'ensemble des 500 prélèvements de poulets s'est révélé négatif. En revanche, 1,3 % des 459 prélèvements réalisés chez les dindes a montré la présence de *E. coli* O157.

Enfin, en Slovaquie, Pilipcinec *et al.* (1999) ont montré un taux de contamination plus important : 9,6 % (n=216) des prélèvements fécaux sur des volailles ont révélé la présence de *E. coli* O157, et 19 des souches produisaient les toxines Stx1 et Stx2.

Des équipes européennes ont décrit la présence de STEC, possédant le gène *stx*₂, sur des pigeons (Morabito *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2000).

3 Portage et excrétion de STEC par les animaux sauvages

Une étude menée au sud des Etats-Unis entre 1997 et 1998, montre que le portage est rare chez le cerf de Virginie et que, quand il est décrit, ce ne sont pas les mêmes souches de *E. coli* O157:H7 que chez les bovins (Fischer *et al.*, 2001).

Des cervidés sauvages ont été étudiés au Japon grâce à l'analyse de leurs matières fécales (Asakura *et al.*, 1998). Des souches de STEC isolées se sont avérées porteuses des gènes *stx*₂, *eae* et *ehxA*, ainsi que d'un plasmide très comparable au plasmide de virulence de 90 kilobases de O157:H7. Une autre étude a également permis de mettre en évidence la présence de *E. coli* O157:H7 chez un raton laveur et un pigeon (Shere *et al.*, 1998).

Entre 1997 et 1998, une étude a été réalisée sur des prélèvements de matières fécales d'animaux sauvages des régions arctiques ou antarctiques (Wasteson *et al.*, 1999), sans contact avec le bétail, et ce pour estimer le portage de souches de *E. coli* O157 ou de souches de *E. coli* vérotoxigènes par ces animaux (39 orignaux, 17 rennes, 14 ours polaires, 3 ours bruns, 5 éléphants de mer et 3 pingouins). Tous les prélèvements ont donné des résultats négatifs à part un résultat douteux pour la présence d'une souche de *E. coli* vérotoxigène sur un prélèvement de fèces d'orignal dont les possibilités de contact avec des animaux d'élevage ne pouvaient pas être entièrement exclues.

Au Japon, des souches de STEC présentant *stx*₁ pour O136:H16 et *stx*₂ pour O153:H- ont été isolées à partir d'oiseaux de mer (Makino *et al.*, 2000a). L'analyse des séquences *stx* a montré une parenté étroite avec les séquences des bactéries d'origine humaine.

QUESTION N°23 : QUE SAIT-ON DE LA PRESENCE ET DE LA SURVIE DES STEC DANS L'ENVIRONNEMENT ?

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. Ces pathogènes peuvent ensuite à travers les sols, les cultures, les eaux et les sédiments présenter un risque potentiel de contamination de l'homme ou de l'animal.

Ce risque nécessite de prendre en compte le comportement des STEC dans l'environnement. En effet les doses infectieuses, pour l'homme, étant faibles (voir Section I), toute survie ou croissance dans le milieu environnemental peut avoir des conséquences importantes en terme de santé humaine.

1 Dans les fèces

Les essais de survie réalisés concernent des fèces artificiellement contaminées par divers sérogroupes, à différents niveaux et dans des conditions expérimentales variées. Il est donc difficile de comparer les résultats entre eux. Cependant, certains éléments peuvent être retenus en ce qui concerne les conditions de la survie des STEC.

En général, le nombre de STEC ensemencé expérimentalement dans les matières fécales tient compte des données de la littérature concernant le taux d'excrétion chez les animaux : de 10^2 à 10^7 ufc/g de matières fécales (Shere *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1995)

Dans le cas de fèces de bovins artificiellement contaminées entre 10^1 et 10^5 ufc/g (O157, O26 et O111), les *E. coli* ont été retrouvés jusqu'à 126 jours de stockage à $+15^\circ\text{C}$ (Fukushima *et al.*, 1999). D'autres essais réalisés à partir de fèces de bovins artificiellement contaminées ($7 \cdot 10^7$ ufc/g) et incubées à $+18^\circ\text{C}$ ont montré que le nombre de *E. coli* O157:H7 était encore de $3,8 \cdot 10^6$ ufc/g après 54 jours (Maule, 2000).

D'autres auteurs ont contaminé des fèces de bovins à 10^8 ufc/g à partir d'une souche non toxigène de *E. coli* O157:H7 et stocké ces échantillons dans des conditions variables de température et de type de support. Pour les échantillons conservés dans un sac stérile en laboratoire ($+10^\circ\text{C}$) ou en extérieur ($-6,5$ à $+19,6^\circ\text{C}$), le nombre de *E. coli* O157:H7 a subi 4,5 à 5,5 RD en 99 jours. En revanche, pour l'échantillon déposé sur une parcelle de sol herbeux (conditions de température identique à l'essai précédent), le nombre de *E. coli* a diminué de façon beaucoup plus importante : 4 à 5 RD en 50 jours. Cependant, les *E. coli* étaient encore détectables dans 70 % des échantillons de sol après 85 jours et dans 20% des échantillons après 99 jours (Bolton *et al.*, 1999).

La température de stockage, l'activité de l'eau (a_w) et le niveau de contamination initial des fèces influent sur la survie des *E. coli* O157:H7. Dans des fèces artificiellement contaminées par un mélange de 5 souches et conservées dans des sacs stériles non fermés (Wang *et al.*, 1996), la survie est plus longue pour une température de stockage de $+5^\circ\text{C}$ que pour $+22^\circ$ ou $+37^\circ\text{C}$ (respectivement 70 jours, 56 jours et 49 jours pour une contamination initiale des fèces de 10^5 ufc/g). Les auteurs soulignent l'influence de l' a_w sur la survie des bactéries, en effet pour des températures de $+22^\circ\text{C}$ ou $+37^\circ\text{C}$, l' a_w des fèces en fin de stockage est inférieure à 0,5, alors qu'elle reste voisine de 0,98-0,99 pour un stockage à $+5^\circ\text{C}$.

Dans des conditions expérimentales différentes (sacs fermés), d'autres auteurs montrent que les *E. coli* O157 mais aussi les O26 et O111 survivent plus longtemps à $+15^\circ\text{C}$ qu'à $+5^\circ\text{C}$ ou $+25^\circ\text{C}$ (Fukushima *et al.*, 1999) : à une température de $+25^\circ\text{C}$, les bactéries peuvent être isolées dans les fèces 12 semaines après une contamination initiale de 10^3 ou 10^5 ufc/g de matière fécale ; à $+15^\circ\text{C}$, les *E. coli* sont retrouvés 8 semaines après une contamination initiale de 10 ufc/g et jusqu'à 18 semaines pour une contamination initiale de 10^5 ufc/g ; à une température de $+5^\circ\text{C}$, les *E. coli* sont retrouvés entre 2 et 14 semaines pour une contamination initiale de 10^5 ufc/g.

Les souches isolées des fèces de bovins après plusieurs jours de stockage peuvent conserver leur capacité de virulence. Sur 24 isolats de *E. coli* O157:H7 testés, tous ont gardé la capacité de produire les toxines Stx1 et Stx2 après survie dans des fèces de bovins : 49 jours à $+37^\circ\text{C}$, 56 jours $+22^\circ\text{C}$ et 70 jours à $+5^\circ\text{C}$ (Wang *et al.*, 1996).

2 Dans les fumiers et les lisiers

L'épandage sur le sol afin de fertiliser les cultures est un bon moyen de recycler l'azote et le phosphore contenu dans les déjections. Toutefois celles-ci peuvent également contenir des STEC (Fenlon *et al.*, 2000; Pell, 1997). En 1992, dans le Maine, aux Etats-Unis, une infection par *E. coli* O157:H7 est décrite chez un patient au régime alimentaire végétarien, consommant les produits de son jardin (Cieslak *et al.*, 1993). Ce dernier était fertilisé avec du fumier de bovins présentant une sérologie positive pour *E. coli* O157:H7. Ce cas montre les capacités de résistance de la bactérie dans le fumier, sur le sol et les végétaux. D'autres auteurs relatent des cas d'infections à *E. coli* O157 liés à la consommation de pommes de terre fertilisées à partir de fumier de bovins (Chapman *et al.*, 1997) (voir Section D-Tableau 2).

Aux Etats-Unis, une étude montre que des actions menées au stade des pratiques d'élevage et de la gestion des fumiers (Hancock *et al.*, 1997a) peuvent permettre de réduire les risques d'exposition des personnes vis-à-vis du risque représenté par les *E. coli* O157:H7.

E. coli O157:H7 peut se multiplier dans du fumier de bovin humide maintenu à 37°C ; après inoculation à un niveau de $7,84 \pm 0,1 \log_{10}$ ufc/g, la quantité de bactéries dénombrées après 3 jours est de $6,52 \pm 0,32 \log_{10}$ ufc/g, et de $8,25 \pm 0,05 \log_{10}$ ufc/g après 5 jours (Delazari *et al.*, 1998).

Une étude dans des conditions de laboratoire évalue le temps de réduction décimale pour une population de *E. coli* O157:H7 inoculée dans du fumier ou du lisier de bovin maintenu à température constante (Himathongkham *et al.*, 1999). Pour le fumier, les dénombrements sont effectués à partir de prélèvements en surface et en profondeur. A 4°C, le temps de réduction décimale est évalué pour le fumier à 9 jours en surface et à 18,5 jours en profondeur et pour le lisier à 38,8 jours. A 20°C, les valeurs évaluées sont respectivement de 21,6 jours, 13,5 jours et 7,67 jours ; à 37°C, elles sont de 8,9 jours, 3,58 jours et 2,25 jours. Les conditions de laboratoire sont toutefois assez éloignées des conditions de terrain, notamment pour le fumier où l'élévation de température consécutive à la dégradation aérobie de la matière organique joue un rôle important dans l'inactivation des bactéries pathogènes présentes.

Pour d'autres auteurs (Kudva *et al.*, 1998), les *E. coli* O157:H7 ont survécu pendant plus d'un an (jusqu'à 21 mois pour un échantillon) dans du fumier obtenu à partir de fèces d'ovins infectées expérimentalement et conservées dans des conditions environnementales réelles et en anaérobiose. Dans des conditions expérimentales similaires mais en aérobie, *E. coli* O157 a survécu 4 mois (fèces d'ovins) et 47 jours (fèces de bovins). Enfin, des contaminations artificielles de fèces à différentes températures (-20°C, +4°C, +23°C, +45°C et +70°C) ont montré que la survie était meilleure pour des températures inférieures à +23°C et des échantillons conservés en anaérobiose. La bactérie a également survécu 100 jours dans du fumier de bovins congelé à -20°C ou dans du fumier d'ovins incubé à +4°C ou +10°C.

Après 50 jours d'incubation d'une souche de *E. coli* O157 dans des fèces de bovins, les pathogènes étaient facilement détectables, en revanche, dans le lisier, les *E. coli* O157ensemencés à la concentration de 10^6 ufc/mL n'étaient plus détectables après 10 jours (Maule, 2000).

Lung *et al.* (2001) ont étudié les effets du compostage sur le devenir des *E. coli* O157 dans le fumier ; quand une température de 45°C est atteinte, les bactéries ne sont plus isolées dans le compost au bout de 3 à 4 jours. Cependant, au Royaume-Uni, en août 1997, lors de la survenue d'un événement épidémique chez des enfants, après un séjour dans une ferme pédagogique, la même souche de *E. coli* O157:H7 a été retrouvée chez les enfants malades et dans des prélèvements de compost préparé depuis 3 mois (Chapman *et al.*, 2000a).

3 Sur ou dans le sol

Des facteurs tels que la température, le degré d'humidité, la flore de compétition ou le ratio sol/fumure semblent jouer un rôle dans la survie de *E. coli* O157:H7. Ainsi, après contamination artificielle d'un sol autoclavé et additionné de fumure, des auteurs ont retrouvé des *E. coli* O157:H7 (humidité constante) jusqu'à 77 jours (+5°C), 226 jours (+15°C) et 231 jours (+21°C). Dans les mêmes conditions, la population de pathogènes était fortement diminuée lorsque l'échantillon de sol n'était pas stérilisé au préalable (56, 152 et 193 jours respectivement). En ce qui concerne le ratio fumure/sol, les *E. coli* ont été retrouvés pendant plus longtemps lorsque des traces de fumure (ratio 1:25 à 1:100) sont ajoutées au sol que lorsque ce ratio est de 1:10 (essais à +15°C et +21°C) (Jiang *et al.*, 2002).

La survie des *E. coli* O157 a également été étudiée en conditions réelles à partir de 3 types de sols (Fenlon *et al.*, 2000). Le sol sablonneux est celui qui permet la moins bonne survie des *E. coli* (perte de cultivabilité sur gélose CT SMAC des 10^5 *E. coli* O157 en 8 semaines). Pour les parcelles de sols argileux ou de terreau, la survie des *E. coli* O157 est beaucoup plus longue (perte de cultivabilité après environ 25 semaines).

La survie des *E. coli* O157 semble meilleure dans des microcosmes formés de particules de sol et d'herbe (Maule, 2000). Ainsi, après 130 jours d'incubation à une température de 18°C, 1.10^6 à 1.10^7 ufc/g ont été retrouvés dans un sol inoculé à 1.10^8 ufc/g.

Dans d'autres essais, des *E. coli* O157:H7 ont servi à contaminer artificiellement des fèces de bovins à un taux d'environ 10^8 ufc/g (Bolton *et al.*, 1999). Un des échantillons a été déposé à la surface d'un pré. Le nombre de *E. coli* O157:H7 a diminué de 4 à 5 RD au bout de 50 jours mais ces bactéries étaient encore détectables dans le sol après 99 jours.

Des essais de laboratoire sur des échantillons de sol montrent la possibilité de multiplication de la souche *E. coli* O157:H7 (Gagliardi and Karns, 2000).

Un essai de modélisation (Ogden *et al.*, 2002; Strachan *et al.*, 2001) a été réalisé à partir de l'étude d'un foyer d'infection par *E. coli* O157:H7, chez des scouts, lors d'un campement dans un pré où des moutons avaient pâturé, pendant 6 jours et avec de mauvaises conditions climatiques (pluie, sol boueux). A 5°C, le temps de réduction décimal de *E. coli* O157:H7 dans du fumier ou du lisier appliqué sur le sol est estimé à 16 ± 2 jours. La quantité de sol ingérée par les enfants est estimée entre 30 et 200 mg/24 heures. Trois semaines après l'épisode décrit chez les scouts, *E. coli* O157:H7 est retrouvé dans 100 % des prélèvements de fèces d'animaux analysés et 60 % des prélèvements de sol, à des taux allant de 3 à $1,1 \cdot 10^3$ ufc/g pour les fèces et de l'ordre de 3 ufc/g pour le sol.

Une étude sur différents types de sol évalue les capacités de résistance de *E. coli* O157:H7 (Gagliardi and Karns, 2002). La bactérie peut encore être isolée 25 à 41 jours après son dépôt sur un sol en jachère, mais jusqu'à 92 et 96 jours après son dépôt sur un sol après fauchage d'une récolte de luzerne ou de seigle. L'étude montre en outre la compétition entre la souche de *E. coli* O157:H7 ajoutée et la flore indigène du sol et notamment avec la population de coliformes. La présence d'argile dans le sol augmente les capacités de survie. Le gel, même sur de longues périodes, permet de conserver la viabilité de *E. coli* O157:H7.

La persistance de *E. coli* O157:H7 dans l'environnement peut être due à une multiplication à l'intérieur de protozoaires du sol (Barker *et al.*, 1999).

Les capacités de résistance des *E. coli* O157:H7 dans l'environnement font qu'un délai de 3 semaines entre la présence d'animaux d'élevage sur un terrain et son usage pour diverses activités de loisir semble insuffisant pour éviter le risque de contamination des humains par des souches de *E. coli* O157:H7 (Brown *et al.*, 2002).

4 Dans l'eau de ruissellement et/ou de lessivage des sols après épandage

En Grande Bretagne, l'importance de la contamination hydrique des rivières et des lacs est liée à deux facteurs principaux : la fertilisation des pâtures ou des sols et la résistance du sérotype O157 au stress environnemental (Chart, 1998).

Dans l'étude de laboratoire de Gagliardi *et al.* (2000), une souche *E. coli* O157:H7 est retrouvée, après 24 heures, au même taux que dans l'*inoculum* tant dans l'eau de lessivage du sol et que dans les couches profondes de l'échantillon. Cette étude montre que la bactérie peut être retrouvée non seulement dans l'eau de ruissellement, mais aussi dans l'eau de lessivage quand la structure du sol est dégradée, avec, dans ce cas une contamination possible des eaux profondes de la nappe phréatique.

La survie et le transport des *E. coli* et des *E. coli* O157 a été étudiée après épandage du fumier de bovins sur une prairie et sur une parcelle de chaume en Ecosse (Ogden *et al.*, 2001). Pour *E. coli*, la perte par lessivage allait de 0,2 à 10 % et était dépendante du niveau de précipitation (la perte obtenue avec *E. coli* O157 était sensiblement la même voire un peu plus importante).

D'après les auteurs, ces essais montrent que le risque lié à une pollution de l'eau est plus important immédiatement après application du fumier (les premières pluies transportent des quantités importantes de *E. coli*). Par la suite le risque diminue fortement. Les auteurs précisent ainsi que si les conditions météorologiques sont bonnes (pas de pluie) après l'application de fumier sur des sols bien travaillés, il est peu probable d'avoir des lessivages importants.

Les mêmes remarques ont été faites concernant l'épidémie de mai 2000 à Walkerton au Canada (O'Connor, 2002).

5 Dans les eaux usées

La capacité de survie de *Escherichia coli* dans les eaux usées a été étudiée. Le T90, temps nécessaire à l'inactivation de 90 % des bactéries présentes atteint 21 jours en l'absence de l'action de rayonnement UV (Arana *et al.*, 2001), alors que sous l'effet de ces rayons il n'est que de 1 jour. Dans cette étude, les capacités de transfert de plasmide ne semblent pas altérées chez les bactéries encore cultivables.

Au Japon (Kaneko *et al.*, 2001), une étude sur les capacités d'un système simple d'épuration des eaux usées domestiques à éliminer des souches de *Escherichia coli* pathogènes et de salmonelles montre que son efficacité dépend d'une part de la charge en matière organique dissoute et d'autre part de la température, 4 RD peuvent être obtenues aussi bien pour les salmonelles que les *E. coli* à +30°C ou encore à +20°C, mais le système n'est plus efficace pour une température des eaux usées de +10°C.

Une étude réalisée au Japon au début de l'année 1997 (Kurokawa *et al.*, 1999) sur les eaux d'une rivière fortement polluées par des eaux usées domestiques a permis la détection régulière, par une technique de PCR directe *in situ*, de bactéries portant le gène *stx*₂. Cependant, aucune information n'est donnée sur l'activité et l'infectivité des souches porteuses de ce gène.

En France, des essais de détection de STEC ont été réalisés à partir d'eaux usées urbaines naturellement contaminées (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). Une souche de *E. coli* O157:H7 potentiellement pathogène a été retrouvée à partir d'un aérateur d'eaux usées. Deux autres souches appartenant au séro groupe O55 et O26 ont également été retrouvées (eaux usées et clarificateur). Les boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines ayant subi des traitements (chaulage, séchage en lit ou en silo, compostage) sont significativement moins contaminées. Leur épandage agricole, après un tel traitement, ne serait par conséquent que peu associé à l'introduction de STEC dans l'environnement (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

6 Dans les eaux de surfaces et les eaux profondes

Ces dix dernières années, des épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7 impliquant une possible contamination de l'homme par l'eau ont été décrites (voir Section D-Question n°13). La présence de *E. coli* O157:H7 dans les prélèvements d'eau permettant de confirmer l'origine de l'infection, a été rarement mise en évidence (Akashi *et al.*, 1994; Anonyme, 1999b; CDC, 1999; O'Connor, 2002). Cependant, l'importance de la contamination hydrique est connue pour les eaux de surfaces et les eaux profondes, en relation avec des pâtures ou des sols fertilisés par les fumiers (Chart, 1998).

E. coli O157:H7 a été isolé pour la première fois de prélèvements d'eau en 1986 aux Etats-Unis (McGowan *et al.*, 1989) et a, par la suite, été mis en évidence dans des rivières, au Japon (Kogure and Ikemoto, 1997; Sakai-city, 1999) et des lacs, aux Etats-Unis (Lee *et al.*, 2002b).

Plusieurs auteurs ont étudié la survie de *E. coli* O157:H7 dans l'eau. Ainsi à une température de 22°C, la survie est possible pendant plus de 300 jours (Warburton *et al.*, 1998). La survie est plus aisée à une température plus basse (Rice *et al.*, 1992). A 8°C, le nombre initial de bactéries ne diminue que de 1 à 2 RD en 91 jours, alors qu'à 25°C, la diminution peut être supérieure à 3 RD entre 45 et 84 jours. Cependant, le dénombrement des formes viables montre que leur nombre reste sensiblement le même au bout de 12 semaines, alors que les cultures sur gélose donnent un résultat négatif (Wang and Doyle, 1998).

L'utilisation de la cytométrie de flux permet de mieux étudier l'activité métabolique et les capacités de croissance de ces bactéries dans les eaux de rivière (Tanaka *et al.*, 2000).

La possibilité de survie de *E. coli* O157 dans le milieu marin a aussi été démontrée expérimentalement au Japon (Miyagi *et al.*, 2001), puis des essais en PCR ont mis en évidence la présence de *stx*₁ et *stx*₂ dans l'eau de mer prélevée dans un estuaire.

7 Dans le réseau de distribution d'eau potable

Il semble qu'aucune étude épidémiologique n'ait été entreprise pour évaluer la présence des STEC dans l'eau de boisson. Cependant, ces pathogènes ont été suspectés ou incriminés lors d'investigations d'épidémie ou de cas groupé de STEC (voir Section D-Question n°13).

QUESTION N°24 : QUE SAIT-ON DE LA PRESENCE DES STEC DANS LES DIFFERENTES FILIERES DE TRANSFORMATION DES DENREES ALIMENTAIRES ?

Plusieurs épidémies liées à STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale (voir Section D–Tableau 2). Ces observations justifient les travaux entrepris dans les filières de transformation afin d'évaluer la prévalence de ces pathogènes.

1 Dans les filières de transformation des viandes

1.1 Viandes bovines

Plusieurs 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, même si on a rarement pu isoler la bactérie à partir de l'aliment incriminé (Griffin and Tauxe, 1991; Tarr *et al.*, 1999).

➤ **Viandes en carcasse**

Chapman *et al.* (1993a) ont réalisé l'examen bactériologique de morceaux de viande prélevés à la surface de carcasses d'animaux afin de vérifier si cet organisme avait été introduit dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. *E. coli* O157:H7 a pu être isolé sur 30,4 % des carcasses d'animaux chez lesquels la bactérie avait antérieurement été isolée du contenu fécal. D'autre part, *E. coli* O157:H7 a également été mis en évidence sur 8 % des carcasses d'animaux non excréteurs de la bactérie, mais côtoyant sur la chaîne d'abattage des carcasses contaminées. Ceci pourrait s'expliquer soit par une contamination croisée sur la chaîne d'abattage pendant le travail sur les carcasses, soit par le fait que les animaux qualifiés de non porteurs sains excrétaient en fait de très faibles quantités de *E. coli* O157:H7 dans leurs fèces, rendant impossible leur détection (Nataro and Kaper, 1998; Vernozy-Rozand and Ray-Gueniot, 1997).

En France, une enquête réalisée en abattoir (Andral *et al.*, 1999a; Andral *et al.*, 1999b; Andral *et al.*, 2000) a démontré la contamination des chaînes d'abattage par *E. coli* O157:H7 à partir des animaux porteurs pour 8 % des prélèvements de surface réalisés (7 prélèvements sur les 50 réalisés ont permis l'isolement de *E. coli* O157, dont 4 possédant l'antigène H7). Ces souches possédaient les facteurs de virulence *stx*₂, *eae*, *ehx*, *katP*. Parmi les surfaces étudiées pour lesquelles des souches possédant des facteurs de virulence ont été isolées, on peut citer les goulottes d'éviscération, les plates-formes de dégraissage, les scies de fente ...

Ces études illustrent le risque de diffusion des bactéries à partir des animaux contaminés par l'intermédiaire de l'environnement et des outils de l'abattoir. Le risque de contamination des locaux et du matériel devrait être évalué et discuté en fonction de la rigueur avec laquelle les mesures d'hygiène sont appliquées dans les abattoirs concernés, en particulier la pratique de l'ensachage du rectum et la désinfection systématique des outils d'abattoir. Aussi, ces constatations renforcent-elles l'intérêt de la mise en oeuvre de mesures d'hygiène préventives rigoureuses lors de l'abattage.

La synthèse bibliographique de Meyer-Broseta *et al.* (2001) montre, pour ce qui concerne les abattoirs, l'absence de *E. coli* O157:H7 sur les veaux analysés aux Etats-Unis comme en Europe (Clarke *et al.*, 1994; Heuvelink *et al.*, 1998c; Martin *et al.*, 1994), alors que la prévalence pour le bétail adulte est de 4 % (Chapman *et al.*, 1996; De Zutter *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 1997). Les fréquences maximales observées sont de 27,8 % sur du bétail à viande adulte aux Etats-Unis (Elder *et al.*, 2000), de 11 % pour le bétail adulte aux Pays Bas (Heuvelink *et al.*, 1998b), de 13,9 % pour des génisses en Belgique (De Zutter *et al.*, 1999). Une moyenne de 13,4 % et de 16,1 % avec des pics atteignant 37 % en été a également été observée au Royaume Uni sur des taureaux et des vaches (Chapman *et al.*, 1997). Aux Etats-Unis, l'enquête de Elder *et al.* (2000) montre une contamination importante des carcasses : 43,4 % avant éviscération et 17,8 % après.

D'après Meyer-Broseta *et al.* (2001), ces résultats confirment l'hypothèse d'une faible contamination en élevage qui augmente au cours du transport vers l'abattoir et la stabulation avant l'abattage du fait des contaminations croisées liées au mélange d'animaux d'origines diverses (Jordan, 1998). Cette observation a également été faite en France (Andral *et al.*, 1999a), à partir des séries d'oreilles positives après prélèvement aux mêmes dates sur les chaînes d'abattoir. Si l'hygiène est correcte en abattoir, la contamination après éviscération sera faible.

Ainsi, selon les études britanniques, la prévalence passe de 0,3 % en élevage (Synge and Hopkins, 1994) à 4 % en abattoir (Chapman *et al.*, 1993a), voire, plus récemment, jusqu'à 14,7 % (Chapman *et al.*, 1997). Aux Etats-Unis, les mêmes constats s'imposent, avec toutefois, un taux résiduel de contamination des carcasses plus important (Elder *et al.*, 2000), en particulier dans le cas des abattoirs ayant des chaînes à grande vitesse (plus de 3000 têtes/jour). Meyer-Brosetta *et al.* (2001) en déduisent que la fréquence de contamination des carcasses est le critère le plus fiable pour juger du statut de la viande bovine avant transformation (Elder *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 1998).

➤ Viandes transformées

Dans une étude menée au Royaume Uni, *E. coli* O157:H7 a été isolé dans de la viande hachée de bœuf avec un pourcentage de 3,7 % (Doyle and Schoeni, 1987).

Trois mille cinq cents steaks hachés industriels de bœuf ont été analysés en France. Quatre d'entre eux étaient contaminés par des souches de *E. coli* O157:H7, dont deux étaient issus d'une même mêlée. Les souches isolées étaient *stx*₁+, *stx*₂+, *eae*+ et *ehx*+ (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). D'une manière générale, la contamination des viandes hachées de bœuf par *E. coli* O157:H7 est inférieure à 1 %.

Par contre les chiffres sont plus élevés quand ils concernent la contamination de ces produits par des STEC. La contamination de la viande hachée de bœuf par des STEC varie de 15 à 40 % au Canada (Johnson *et al.*, 1996), aux Etats-Unis (Samadpour *et al.*, 1994) et au Royaume Uni (Willshaw *et al.*, 1993).

En Allemagne, des études ont rapporté des taux d'isolement de *E. coli* producteurs de vérotoxines de 0,71 % dans la viande de bœuf (Bulte *et al.*, 1996). Ce chiffre est bas comparé à ceux cités dans la littérature.

1.2 Viandes de petits ruminants

La viande de petits ruminants (ovins et caprins) n'a que très rarement été suspectée dans des épidémies alimentaires et les études réalisées pour déterminer la prévalence des STEC dans cette viande sont rares.

Chapman *et al.* (2000b) ont montré que 4,1 % des saucisses d'agneaux et 3,7 % des échantillons de viande hachée de mouton, achetés dans des magasins britanniques de vente au détail, étaient contaminés par *E. coli* O157:H7. Une étude faite dans le Wisconsin (Etats-Unis) par Doyle (1991) montre qu'on peut isoler *E. coli* O157:H7 dans de la viande d'agneau, avec un pourcentage d'isolement de 2 %. Brooks *et al.* (2001) montrent que 17 % des échantillons de viande d'agneau commercialisée en 2000 en Nouvelle Zélande, étaient contaminés par des STEC. Enfin, en Allemagne, des études ont rapportées des taux d'isolement de *E. coli* vérotoxiques de 2,56 % dans de la viande d'agneau et de 72,4 % sur des carcasses de mouton (Beutin *et al.*, 1995).

Par contre, Heuvelink *et al.* (1999a) n'ont pas pu isoler de *E. coli* O157:H7 à partir de viande d'agneau testée en Hollande.

1.3 Viandes porcines

Les accidents alimentaires dus aux STEC impliquant des aliments à base de viande de porc sont rares (Paton *et al.*, 1996; Tilden *et al.*, 1996) (voir Section D-Tableau 2).

Dans la viande de porc, les STEC sont présents dans 0 à 11 % des échantillons testés suivant les études (Brooks *et al.*, 2001; Pierard *et al.*, 1997; Read *et al.*, 1990; Suthienkul *et al.*, 1990). Mais des résultats plus élevés ont été obtenus : Samdapour *et al.* (1994) ont détecté les gènes *stx* dans 18 % des 51 échantillons analysés ; Smith *et al.* (1991) dans un quart des 184 saucisses testées en Grande-Bretagne et Bouvet *et al.* (2002b) dans 15 % des 2 146 échantillons analysés, en France. Sur les carcasses de porcs à l'abattoir, des prévalences hétérogènes ont été décrites avec moins de 5 % (Gill and Jones, 1998; Leung *et al.*, 2001) mais jusqu'à 50 % pour une étude française (Bouvet *et al.*, 2001).

Certains auteurs montrent une prévalence de *E. coli* O157:H7 dans la viande fraîche crue de porc inférieure à 2 % (Doyle and Schoeni, 1987; Doyle, 1991; Heuvelink *et al.*, 1999a). Une étude française (Bouvet *et al.*, 2002b) a permis de détecter le gène *uidA* spécifique de O157:H7 dans 0,1 % des 2 146 échantillons testés mais sans isolement de souches. Gill et Jones (1998) ont également recherché la présence de *E. coli* O157:H7 sur la langue d'animaux abattus : 2 langues positives sur 40 analysées.

La prévalence des STEC et de O157:H7 reste donc globalement faible tant chez les animaux vivants que dans la viande. Le point le plus rassurant concernant les souches de STEC isolées dans la filière porcine (animaux vivants, carcasses, viande fraîche ou produits à base de viande) reste le fait que la majorité de ces souches possédait uniquement le gène *stx_{2e}*.

1.4 Viandes de volailles

Des toxi-infections alimentaires dues à *E. coli* O157:H7 et autres STEC mettant en cause de la viande de volailles ou des produits à base d'œufs n'ont jamais été rapportées à ce jour (voir Section D-Tableau 2).

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou d'autres STEC dans les viandes de volailles, différentes enquêtes ont été menées, mais les résultats sont disparates.

Certains auteurs concluent que la contamination des filières « dinde » et « poulet » est importante et que l'on devrait en tenir compte dans la diffusion du danger. Dans une étude américaine, Doyle et Schoeni (1987) furent les premiers à mettre en évidence O157:H7 dans le poulet : 4 % des échantillons réalisés sur des carcasses crues (n=263) étaient contaminés par *E. coli* O157:H7. Toujours aux Etats-Unis, Samadpour *et al.* (1994), montre que 12 % des carcasses de poulets crus testées ainsi que 7 % des carcasses crues de dindes étaient contaminées par des *E. coli* vérotoxiques. En France, une étude menée par Vernozzy-Rozand *et al.* (1997), portant sur 250 échantillons d'aliments différents pris dans le commerce, a montré que 4 échantillons sur 110 de poulet étaient contaminés par *E. coli* O157, mais il s'agissait de souches non-productrices de vérotoxine.

Au contraire, d'autres études réalisées sur des produits de volailles ne révèlent pas de contamination. Aux Etats-Unis, Levine *et al.* (2001), dans le cadre d'un plan de surveillance des aliments en sortie d'usine, n'ont trouvé aucun produit de volaille contaminé par *E. coli* O157:H7. Aux Pays-Bas, entre 1996 et 1997, 819 échantillons de produits frais issus de volailles, prélevés en supermarché et chez les bouchers, ont été analysés pour la recherche de STEC O157: l'ensemble s'est révélé négatif (Heuvelink *et al.*, 1999a). En Angleterre, des échantillons de poulet ont été examinés afin de rechercher la présence de STEC à l'aide de sonde ADN : les résultats s'avèrent négatifs (Smith *et al.*, 1991). Enfin, des prélèvements réalisés sur des carcasses, le long de la chaîne d'abattage, dans le cadre d'enquête de prévalence de STEC en Angleterre (Chapman *et al.*, 1997) et aux Etats-Unis (Read *et al.*, 1990), se sont également révélés négatifs.

Concernant la présence de *E. coli* O157:H7 ou d'autres STEC dans les œufs, aucun résultat n'est disponible. Schoeni et Doyle (Schoeni and Doyle, 1994) ont travaillé à partir d'inoculation artificielle orale de poules. Ils ont ainsi mis en évidence que *E. coli* O157:H7 pouvait se retrouver sur les coquilles des œufs issus de ces poules (13,9 %), mais pas dans le contenu, selon les conditions d'expérimentation.

Par ailleurs, il ne semble pas exister de donnée sur la possible contamination des produits à base d'œufs.

D'une manière générale, comme le suggèrent le Tableau 7 et le Tableau 8, la contamination des denrées alimentaires par les STEC est toujours plus importante que leur contamination par le seul sérotype O157:H7 (Samadpour *et al.*, 1994).

Tableau 7 : Présence des STEC dans les viandes

	Pays	Aliment	Détection	Références
STEC	Thaïlande	Bœuf cru	8/93 (8,6 %)	(Suthienkul <i>et al.</i> , 1990)
		Poulet cru	1/107 (0,9 %)	
		Porc cru	1/111 (0,9 %)	
		Légumes crus	0/130 (0 %)	
	Canada	Bœuf cru	82/225 (36 %)	(Read <i>et al.</i> , 1990)
		Porc cru	25/235 (11 %)	
Poulet cru		0/200 (0)		
Royaume Uni	Bœuf haché cru	17/134 (13 %)	(Willshaw <i>et al.</i> , 1993)	
	Saucisse de bœuf crue	9/52 (17 %)		
	Beef burger cru	27/124 (22 %)		
Etats-Unis	Etats-Unis	Bœuf cru	14/60 (23 %)	(Samadpour <i>et al.</i> , 1994)
		Porc cru	9/51 (18 %)	
		Agneau cru	10/21 (48 %)	
		Veau cru	5/8 (63 %)	
		Poulet cru	4/33 (12 %)	
		Dinde crue	1/15 (7 %)	
France	France	Porc cru	340/2800 (12 %)	(Bouvet <i>et al.</i> , 2001)
		Bœuf cru	47/411 (11 %)	(Pradel <i>et al.</i> , 2000b)

Tableau 8 : Présence de *E. coli* O157:H7 dans les viandes

	Pays	Aliment	Détection	Références
<i>E. coli</i> O157:H7	Etats-Unis	Bœuf cru	6/164 (3,7 %)	(Doyle and Schoeni, 1987)
		Porc cru	3/264 (1,5 %)	
		Volaille crue	4/263 (1,5 %)	
		Agneau cru	4/205 (2 %)	
	Canada	Bœuf cru	4/165 (2,4 %)	(Sekla <i>et al.</i> , 1990)
	Etats-Unis	Bœuf cru	3/107 (2,8 %)	(Padhye and Doyle, 1991)
		Lait cru	11/115 (10 %)	
	Etats-Unis	Bœuf cru	2/1668 (0,1 %)	(Griffin and Tauxe, 1991)
		Foie de veau cru	9/4953 (0,2 %)	
		Poulet cru	0/3977 (0 %)	
Etats-Unis	Bœuf cru	0/1400 (0 %)	(Tarr <i>et al.</i> , 1999)	
Hollande	Bœuf cru	2/1469 (0,4 %)	(Heuvelink <i>et al.</i> , 1999a)	
	Steak haché (bœuf et porc)	1/147 (0,7 %)		
France	Bœuf cru haché	4/3500 (0,1 %)	(Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2002)	
Australie	Mouton désossé	(1,3 %)	(Phillips <i>et al.</i> , 2001)	
Royaume Uni	Steak haché	(0,44 %)	(Chapman <i>et al.</i> , 1992)	

2 Dans les filières lait et produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis quelques années (voir Section D-Tableau 2).

En Angleterre, en 1993, *E. coli* O157:H7 est isolé pour la première fois : il s'agissait de lait non pasteurisé (Chapman *et al.*, 1993b).

La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. 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 voie de contamination du lait avant la traite.

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou d'autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles. Il faut, cependant, souligner la difficulté de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange, due au facteur de dilution.

En France, la prévalence est mal connue, car les études sont peu nombreuses. Les résultats d'une étude multicentrique réalisée en 1999 sur la contamination des produits laitiers par les STEC utilisant la méthode PCR-Elisa ont donné un signal positif pour la recherche des gènes *stx* pour 21,5 % des laits collectés (n= 205), 30,5 % des fromages au lait cru (n= 180), et 8,9 % des fromages au lait pasteurisé (n= 45) (Fach *et al.*, 2001). Dans le cadre du plan de surveillance mis en oeuvre par la DGAL en 2000/2001 sur la contamination microbiologique des fromages au lait cru, la présence du gène codant pour les vérotoxines a été détectée dans 13 % des 1039 échantillons analysés (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

En Europe, différentes études ont été menées, montrant une prévalence très faible dans le lait cru et les produits laitiers à base de lait cru. Klie *et al.* (1997), dans le cadre d'essais pour la mise en place d'une méthode d'analyse pour le contrôle officiel, ont recherché les STEC dans 273 échantillons de lait cru (lait cru et lait cru certifié) provenant de 5 régions différentes d'Allemagne. Des STEC ont été isolés de 3,9 % des échantillons de lait cru, et de 2,1 % des échantillons de lait cru certifié ; aucune souche, sauf une qui était O157:H-, n'appartenait au séro-groupe O157.

Aux Pays Bas, Heuvelink *et al.* (1998a) ont réalisé une enquête sur 1011 échantillons de lait cru, prélevés dans les tanks de différentes fermes laitières : aucun STEC n'a été mis en évidence (détection par IMS). Par contre, l'étude de prévalence de *E. coli* O157:H7 réalisée chez les animaux et sur le lait de ces animaux dans des fermes laitières des Pays Bas, a montré un seul échantillon de filtrat de lait positif sur les 7 analysés (Heuvelink *et al.*, 1998c).

En Angleterre, Mechie *et al.* (1997) ont réalisé une étude sur une ferme impliquée dans des cas d'infections humaines à *E. coli* O157. Durant quinze mois, plus de 3900 prélèvements ont été réalisés, dont 329 échantillons de lait. *E. coli* O157:H7 n'a jamais été isolé des prélèvements issus du tank à lait ; en revanche, ce sérotype a été isolé d'échantillons pris au pis de 2 vaches excrétrices.

En Italie, la prévalence était également de nulle. Sur 100 échantillons de lait prélevés dans les tanks de 8 fermes, ni la présence du sérotype O157:H7 ni la présence de vérotoxine n'a été mise en évidence (Massa *et al.*, 1999).

Enfin, Coia *et al.* (2001), en Angleterre, au cours d'une enquête portant sur 500 échantillons de lait cru prélevés dans des tanks de fermes et sur 739 échantillons de fromages au lait cru pris dans des magasins, n'ont isolé aucune souche de STEC.

Aux Etats-Unis, plusieurs enquêtes ont été menées. Une enquête de prévalence sur *E. coli* O157:H7 dans 30 fermes productrices de lait, a révélé que sur 268 prélèvements de lait effectués dans les tanks, la présence de *E. coli* O157:H7 a été détectée dans seulement 2 échantillons, soit 0,75 % (Murinda *et al.*, 2002). Une autre enquête sur des laits crus de 131 fermes a montré la présence de 5 souches de STEC (4 Stx1 et 1 Stx2), mais pas le sérotype O157:H7 (Jayarao and Henning, 2001). Dans le cadre d'une étude, 1104 échantillons de produits laitiers et d'environnement d'entreprises laitières ont été analysés, dont 42 échantillons de lait cru et 19 fromages à pâte molle, pour la recherche de *E. coli* O157:H7 : tous se sont révélés négatifs (Ansay and Kaspar, 1997).

Toujours aux Etats-Unis, Padhye et Doyle (1991), dans le cadre de la mise au point d'une méthode rapide de détection de *E. coli* O157:H7 dans différentes matrices alimentaires, ont fait des essais sur 115 échantillons de lait crus : 10 % étaient positifs.

3 Dans les filières produits de la pêche

Rares sont les travaux visant à déterminer la prévalence des STEC dans les produits de la pêche.

➤ Coquillages

En France, une étude (Dupray *et al.*, 1999) montre que des *E. coli* vérotoxiques peuvent être potentiellement retrouvés dans des coquillages en aval d'une zone agricole : 19 % des échantillons de coquillages analysés (7/36) étaient positifs. La zone de production des coquillages analysés était classée B, ce qui implique un passage en bassin de purification avant leur commercialisation.

La présence de *E. coli* O157:H7 ou de STEC a été également recherchée dans des coquillages mis sur le marché, avec toutefois une grande variabilité parmi les protocoles utilisés. Les résultats obtenus ont montré : aux Etats-Unis, 2/44 échantillons de coquillages (clams) positifs pour la toxine Stx2 (aucun pour la toxine Stx1 ; Samadpour *et al.* (1994), en France, 1/150 échantillons de coquillages (huîtres) possédait un *E. coli* O157:H7-, avec les gènes *stx*₁, *stx*_{2c}, *eae*, *hlyA* (Guyon *et al.*, 2000) et en Inde, 2/48 échantillons de clams positifs pour les gènes *stx* et *hlyA* par PCR, mais aucun ne possédait le gène *rfbO157* codant pour l'antigène O157 (Sanath Kumar *et al.*, 2001). Cette dernière étude signe donc la présence de *E. coli* STEC non-O157 dans les coquillages. Dans une autre étude, les *E. coli* O157 représentaient 12 des 590 souches de *E. coli* (soit 2 %) isolées d'huîtres à Trinidad (Rampersad *et al.*, 1999).

➤ Poissons

Au Japon, des souches de *E. coli* O157:H7 possédant aussi bien *stx*₁ que *stx*₂ ont été isolées (Asai *et al.*, 1999) à partir de laitance de saumon après transformation, cet aliment faisant partie des origines suspectées pour les infections humaines observées en 1998.

4 Dans les filières végétales

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination des personnes par les STEC et en particulier *E. coli* O157:H7. Différents végétaux ont été mis en cause (voir Section D-Tableau 2), comme par exemple, la laitue (Ackers *et al.*, 1998; Hilborn *et al.*, 1999), des pousses de luzerne (Breuer *et al.*, 2001; Fratamico and Bagi, 2001; Mohle-Boetani *et al.*, 2001) ou encore des pousses de radis blanc (Taormina *et al.*, 1999).

En ce qui concerne les pousses de certains végétaux, la contamination des graines par *E. coli* O157:H7 est possible avant la germination (Breuer *et al.*, 2001). Dans ce cas, au cours de la germination en bassin, il peut y avoir multiplication des bactéries, phénomène décrit par exemple au cours de la germination des graines de haricot mungo, appelé « soja » en France (Taormina *et al.*, 1999). Il peut aussi y avoir une contamination de l'eau utilisée dans les bassins de germination (Fratamico and Bagi, 2001) et dans ce cas une contamination des pousses végétales au cours de la germination.

Si les graines de luzerne sont contaminées par *E. coli* O157:H7 avant germination, il est possible de retrouver jusqu'à plus de 10^7 ufc/g de pousses de luzerne (Taormina and Beuchat, 1999b). Les bactéries présentes résistent bien aux désinfectants, les procédures préconisées aux Etats-Unis pour décontaminer les pousses de végétaux avant consommation s'avèrent alors inefficaces pour éliminer *E. coli* O157:H7 (Taormina and Beuchat, 1999a). Comme pour *Salmonella sp.* (Beuchat, 1997), l'élimination totale des *E. coli* O157:H7 par 1800 mg/L de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ est impossible (Taormina and Beuchat, 1999a). Il s'agit de bactéries adhérentes à la surface des végétaux et donc de ce fait difficiles à éliminer (voir Section G-Question n°33).

Quand *E. coli* O157:H7 est isolé après germination, la bactérie est toujours cultivable après un traitement de blanchiment des pousses végétales à 100°C pendant 30 secondes (Fratamico and Bagi, 2001).

Au laboratoire, des formes viables de *E. coli* O157:H7 sont retrouvées non seulement à la surface de pousses de radis après contamination expérimentale des graines avant germination, mais aussi dans les tissus internes des végétaux (Itoh *et al.*, 1998).

Le lien peut être fait entre l'utilisation de produits d'origine animale contaminés par *E. coli* O157:H7 pour fertiliser les champs (fumiers, fientes de volailles, ...) et la contamination des végétaux qui y sont cultivés, comme par exemple des laitues (Hilborn *et al.*, 1999). Sur les végétaux contaminés, les bactéries montrent une adhésion plus importante à la base des feuilles (Takeuchi *et al.*, 2000). Cependant l'arrosage par ruissellement à la surface du sol semble une pratique moins à risque que l'arrosage par aspersion sur les feuilles des végétaux (Solomon *et al.*, 2002a).

E. coli O157:H7 peut pénétrer dans les tissus végétaux à la jonction entre les cellules. Ce phénomène est plus important quand les salades sont conservées à une température de 4°C, la pénétration des bactéries dans les tissus végétaux leur permet alors de mieux résister à la chloration (Takeuchi and Frank, 2000). Il n'y a pas de différence significative dans les capacités de survie et de croissance de *E. coli* O157:H7 sur les feuilles de laitue avant ou après chloration (Li *et al.*, 2001).

Pour fertiliser le sol où sont cultivées des salades, l'application de fumier contaminé par *E. coli* O157:H7 associée à un arrosage peut permettre un passage des bactéries dans les parties plus profondes du sol (Solomon *et al.*, 2002b). Une contamination des racines des végétaux est alors possible et semble pouvoir être à l'origine de la contamination par voie interne des parties comestibles de la plante.

Des épidémies ont aussi été décrites à la suite de la consommation de produits transformés d'origine végétale contaminés par *E. coli* O157:H7 et en particulier du jus de pomme non pasteurisé et sans conservateur (Besser *et al.*, 1993; Steele *et al.*, 1982).

L'utilisation de conservateurs comme le benzoate de sodium permet de réduire la survie de *E. coli* O157:H7 (Besser *et al.*, 1993). L'addition de 0,1 % de benzoate de sodium ou de 0,1 % de sorbate de potassium est efficace pour inactiver *E. coli* O157:H7 dans du jus de pomme acide (Zhao *et al.*, 1993). Différents paramètres comme le pH, la température de conservation, un traitement thermique, l'addition de conservateurs, peuvent être combinés pour assurer une réduction significative du nombre d' *E. coli* O157:H7 pouvant contaminer le jus de pomme (Uljas *et al.*, 2001).

QUESTION N°25 : COMMENT SURVEILLE-T'ON LES STEC EN FRANCE, DANS L'ENVIRONNEMENT ET LES ALIMENTS ?

1 Dans l'environnement

Il n'existe à ce jour aucun plan de surveillance et/ou plan de contrôle concernant les STEC et l'environnement en France. Toutefois, une enquête financée par l'Agence de Développement et de Maîtrise de l'Energie et la Direction Générale de l'Alimentation a permis d'aider à déterminer la prévalence des STEC dans l'environnement. Mille échantillons d'effluents d'élevage (lisiers, purins, fumiers) et boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines provenant de 4 départements des régions Bourgogne et Rhône Alpes, ont été ainsi analysés dans le cadre de l'enquête.

La comparaison des dénombrements des coliformes thermotolérants dans les échantillons contaminés en STEC montre l'absence de corrélation entre un nombre significativement élevé en coliformes thermotolérants et la présence de STEC dans l'échantillon (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). A l'inverse, il est même observé pour plus de la moitié des échantillons contaminés en STEC, un dénombrement en coliformes thermotolérants inférieur à la moyenne générale observée par type de matrice concernée. Cet élément suggère que les coliformes thermotolérants ne constitueraient pas un indicateur fiable de la présence de STEC dans l'environnement.

L'enquête réalisée sur 988 échantillons environnementaux (fèces, fumier, lisier d'élevage bovin et porcin, boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines) montre que 21 % sont contaminés par les STEC (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). 26 % des souches isolées possédaient au moins trois facteurs de virulence *stx*, *eae* et *ehx* et devaient par conséquent être considérées comme pathogènes. Ces souches apparaissent aussi bien dans les stations d'épuration urbaines que dans les effluents d'élevages.

2 Dans les aliments

Depuis 1995, plusieurs plans de surveillance et études ponctuelles (notes de services de la DGAI, (Leclerc *et al.*, 2003)). Quatre études concernent la recherche de *E. coli* O157:H7 et une étude concerne les STEC. Les matrices testées sont les steaks hachés de viande de boeuf, les fromages au lait cru et les coquillages vivants. Les laboratoires qui participent à ces études sont généralement les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) volontaires qui sont en mesure de réaliser les analyses et les laboratoires de l'AFSSA ou de l'ENVL qui recherchent certains facteurs de virulence à partir des souches isolées. Les différents facteurs recherchés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) appartiennent à la liste suivante : *stx*₁, *stx*₂, *stx*₂ variant (Shiga-toxine), *eae* (intimine), *hlyA/ehx* (hémolysines), *cnf* (cytotoxic necrotoxic factor), *katP* (catalase-peroxydase), *EAF* (entero-adherent factor) et *eagg* (entero-aggregant factor), *uidA* (β galactosidase), *fliC* (flagelline spécifique de H7).

Les principaux plans de surveillance et études ponctuelles menés en France sur les STEC et les *E. coli* O157 dans les aliments sont référencés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Résultats des études concernant la recherche de *E. coli* O157 (1995-1999) ou de STEC (2000-2001) dans diverses matrices alimentaires (d'après Leclerc *et al.*, (2003))

PERIODE D'ETUDE	MATRICES TESTEES	NOMBRE D'ECHANTILLONS	METHODES UTILISEES	RESULTATS OBTENUS
Juin 1995	Fromages lait cru (chèvres, vaches)	140	VIDAS	Absence
Février à avril 1997	Steacks hachés réfrigérés	90	VIDAS et Pétrifilm PCR (<i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>)	8 <i>E. coli</i> O157:H7 (<i>stx</i> ₂ +, <i>eae</i> +, <i>ehxA</i> +)
Novembre 1997 à Février 1998	Steacks hachés réfrigérés	504	-DYNAL ou VIDAS-Ice ou BAM -PCR (<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> , <i>ehxA</i> , <i>cnf</i> , <i>katP</i> , EAF <i>et eagg</i>)	Absence
	Coquillages vivants (huitres moules)	160		1 <i>E. coli</i> O157 (sans facteurs de virulence)
	Fromages lait cru (chèvres, vaches, brebis)	519		7 <i>E. coli</i> O157 (sans facteurs de virulence)
Janvier à Décembre 1999	Steacks hachés réfrigérés	3450	VIDAS	4 <i>E. coli</i> O157 :H7 (<i>stx</i> ₁ +, <i>stx</i> ₂ +, <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +)
Aout à Novembre 2000	Fromages au lait cru (vache, chèvre et brebis)	414	-PCR (<i>stx</i>) -Identification (hybridation sur boîte)	-11 % des bouillons d'enrichissement <i>stx</i> + -2 souches STEC(<i>stx</i> +, <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +) isolées de 2 échantillons (sérotype non déterminé)
Janvier à Avril 2001		625	-Sérotypage (O157, O26, O103, O111) -PCR (<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> , <i>ehxA</i> , <i>cnf</i> , <i>katP</i> , EAF <i>et eagg</i>)	-15 % des bouillons d'enrichissement <i>stx</i> + -3 souches STEC(37% <i>stx</i> +, 100% <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +) isolées de 16 échantillons (sérotype non déterminé)

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Détermination de la prévalence des STEC et de la caractéristique des souches dans les filières ou produits pas encore évalués à ce jour et/ou potentiellement à risque ; notamment par la mise en place de plan de surveillance dans les abattoirs français et envisager des plans de contrôle.
- ➔ Evaluation du portage des STEC en France pour les différentes espèces d'animaux d'élevage, en fonction des conditions d'élevage.
- ➔ Etablissement à large échelle d'un état des lieux dans les abattoirs français.
- ➔ Quid des traitements d'hygiénisation des déchets et effluents d'élevage avant épandage et des traitements d'assainissement des boues d'épuration ou données plus fines sur la survie et la diffusion des STEC dans les étapes de traitement des boues d'épuration ?

Section F : Isolement et Identification des STEC

Responsable de section : C. Vernozy-Rozand

Rédacteurs : P.Fach - F.Grimont - P. Mariani-Kurkdjian - C. Vernozy-Rozand

POINTS A RETENIR

- Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à la PCR avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx* codant pour la production de vérotoxines ;
- A l'opposé, la majeure partie des souches de *E. coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol et ne produit pas de β -glucuronidase, ce qui permet l'utilisation de milieu dédié comme le SMAC ;
- En France, il existe 2 méthodes validées AFNOR pour l'aliment et le sérotype :
 - IMS-Dynal, reprise dans la norme ISO EN-16654, qui est la méthode de référence en Europe,
 - Vidas-BioMérieux ;
- La méthode recommandée par le groupe de travail de l'Afssa pour la confirmation des colonies suspectes STEC O157 devrait intégrer l'ensemble des étapes suivantes :
 - vérification par agglutination de la présence de l'antigène somatique O157
 - identification de l'espèce *E. coli*
 - recherche des vérotoxines par ELISA ou recherche des gènes *stx* par PCR : cette dernière recherche est recommandée (absence de faux négatif).
- Tous les travaux de recherche sur souches de STEC nécessitent un laboratoire de type P3*.
- De nombreux travaux sont en cours actuellement pour développer des méthodes de détection d'autres sérotypes : O26, O103 et O111 et pour améliorer les méthodes génétiques existantes.

QUESTION N°26 : QUELLES SONT LES METHODES UTILISEES ACTUELLEMENT POUR L'ISOLEMENT ET LA DETECTION DES STEC DANS LES ALIMENTS ?

Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à la méthode Polymerase Chain Reaction (PCR) avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx* codant les vérotoxines.

1 Méthodes biochimiques de détection et d'isolement des STEC

1.1 Propriétés biochimiques de *E. coli* O157:H7 ?

La plupart des réactions biochimiques de *E. coli* O157:H7 sont typiques des *E. coli* à l'exception toutefois de la fermentation du sorbitol et de l'activité β -glucuronidase (Lingwood *et al.*, 1987). Environ 93 % des souches de *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures ; à l'inverse *E. coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol (Neaves *et al.*, 1994). Mais dans différentes études, des souches STEC du sérotype O157:H7 fermentaient le sorbitol en 24 heures (Morgan *et al.*, 1993; Moxley and Francis, 1986; Wilson *et al.*, 1992). La prévalence de ces souches particulières est actuellement non connue, mais il apparaît évident que ces dernières n'auraient pu être mises en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments telles que décrites dans ce document.

En outre, 93 % des *E. coli* sont β -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne produisent pas de β -glucuronidase (Tesh *et al.*, 1991).

Ces caractéristiques biochimiques particulières sont utilisées pour l'isolement de *E. coli* O157:H7.

Ainsi l'absence de fermentation de sorbitol a justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC). Les modifications de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC) ont été mises au point dans l'objectif d'augmenter le caractère sélectif vis à vis de O157:H7.

Okrend *et al.* (1990), Tesh *et al.*, (1991) ont montré que l'addition de 5 bromo-4 chloro-indoxy- β -D-glucuronide (BCIG) ajouté à raison de 0,1 g/L à une gélose MacConkey au sorbitol favorise l'isolement de *E. coli* O157 inoculé volontairement dans des échantillons de viande de bœuf. En effet le BCIG permet de différencier les colonies β -glucuronidase positives de celles qui sont négatives. *E. coli* O157:H7 présente des colonies sorbitol négatives et β -glucuronidase négatives ; ces colonies restent blanches alors que les colonies sorbitol négatives et β -glucuronidases positives virent au vert ou au bleu. L'ajout du BCIG à la gélose SMAC réduit par conséquent le nombre de faux positifs de 36 % par rapport à la simple utilisation du SMAC sans BCIG. En effet *E. coli* O157:H7 a pu être isolé à partir de 11 des 12 échantillons de viande inoculés utilisant le SMAC-BCIG contre 8 sur 12 avec la seule utilisation du SMAC sans BCIG.

Thomson *et al.* (1990) ont développé un test rapide fluorescent pour la détection de *E. coli* O157. Ce test utilise le 4-méthylumbelliféryl β -D-glucuronide (MUG) comme indicateur hydrolysé en un composé fluorescent par l'enzyme β -glucuronidase (Rippey *et al.*, 1987).

Zadik *et al.*, (1993) ont décrit une autre modification dans laquelle le SMAC contient du tellurite et de la céfixime parce que les concentrations minimales inhibitrices sont plus élevées pour les STEC O157 que pour les autres *E. coli* et les bactéries sorbitol négatives telles que *Aeromonas sp.* ou *Plesiomonas sp.*

Des souches *E. coli* O157:H7- fermentant le sorbitol et sensibles aux concentrations élevées de tellurite, donc ne se développant pas sur CT-SMAC ont été décrites par Karch *et al.* (1996).

De nombreux milieux chromogènes ont été mis au point, deux sont spécifiques du sérotype O157:H7 : CHROMagar *E. coli* O157:H7 (CHROMagar) et O157:H7 ID (BioMérieux) (Vernozy-Rozand and Montet, 2001).

1.2 Confirmation des colonies suspectes *E. coli* O157:H7

1.2.1 Utilisation de méthodes phénotypiques en confirmation

Ces méthodes consistent en un test d'agglutination latex réalisé directement sur la colonie suspecte pour vérifier la présence de l'antigène somatique O157. L'identification de l'espèce par utilisation des galeries Api permet de vérifier qu'il s'agit de l'espèce *E. coli*. Enfin, il faut contrôler la présence du flagelle H7. Cette étape exige l'ensemencement de la souche étudiée sur une gélose-mobilité (3 repiquages sont nécessaires) de manière à favoriser la synthèse du flagelle avant son sérotypage à l'aide d'anticorps anti H7. Ces étapes de confirmation prennent de 3 à 4 jours en fonction du délai de reprise de mobilité de la souche.

Ces méthodes sont simples d'utilisation mais longues et par conséquent peu conciliables avec les exigences des industriels de l'agro-alimentaire.

1.2.2 Utilisation de méthodes génétiques en confirmation

A l'opposé des précédentes, les méthodes génétiques permettent une réponse rapide mais exigent une formation du personnel à la méthode PCR. Ces méthodes exposées ci-après sont spécifiques du sérotype O157:H7. La recherche des gènes *stx* codant les vérotoxines apparaît indispensable compte tenu de l'existence de souche *E. coli* O157:H-.

La méthode recommandée par le groupe de travail de l'Afssa pour la confirmation des colonies suspectes STEC devrait intégrer l'ensemble des étapes suivantes :

- vérification par agglutination de la présence de l'antigène somatique O157
- identification de l'espèce *E. coli*
- recherche des vérotoxines par ELISA ou recherche des gènes *stx* par PCR : cette dernière recherche est recommandée (absence de faux négatif).

Tous les travaux de recherche sur souches de STEC nécessitent un laboratoire de type P3*.

➤ **Détection du gène *uidA***

Le gène *uidA*, présent chez toutes les souches de *E. coli*, code pour une β -glucuronidase. Bien que les souches du sérotype O157:H7 ne montrent pas d'activité β -glucuronidasique, elles possèdent tout de même le gène *uidA*. La séquence de ce gène présente, chez *E. coli* O157:H7, plusieurs mutations dont une en position 92, le remplacement d'une thymine par une guanine. Cette particularité est retrouvée chez toutes les *E. coli* O157:H7 et représente donc un marqueur très efficace de ces souches. Feng (1993) a utilisé une sonde oligonucléotidique PF-27 permettant de détecter la région de *uidA* spécifique de O157:H7. Par hybridation sur 239 colonies, il a pu montrer que la sonde PF-27 ne réagissait qu'avec les 17 isolats appartenant au sérotype O157:H7. Aucune hybridation ne s'est produite avec les 73 *E. coli* n'appartenant pas au sérotype O157:H7, les 13 *Shigella sp.* et les 8 *Salmonella sp.* exprimant la β -glucuronidase. L'absence d'hybridation avec *E. coli* indiquait que la sonde PF-27 était suffisamment discriminante pour détecter une variation d'une unique base dans la région 5' du gène *uidA* de *E. coli*. La sonde PF-27 apparaissait donc comme spécifique du seul sérotype O157:H7. Cette forte spécificité pourrait être utile pour la détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments. De plus, elle permettrait de ne pas avoir recours à une confirmation sérologique donc d'éliminer les faux-positifs liés aux réactions croisées avec d'autres bactéries.

Plus récemment, Feng (1995) a montré que cette sonde détectait également les variants phénotypiques immobiles, β -glucuronidase négatifs et fermentant le sorbitol du sérotype O157 : ce sont les souches O157:NM. Ces souches pathogènes et atypiques ont été isolées en Allemagne de patients souffrant d'un syndrome urémique et hémolytique (Gunzer *et al.*, 1992).

➤ **Détection du gène *fliC***

L'antigène flagellaire H7 est l'un des 56 antigènes flagellaires décrits chez *E. coli*. La variabilité de l'antigène H est retrouvée dans le flagelle, formé par un polymère d'une unique protéine, la flagelline. Cette protéine est codée par le gène *fliC*. Les variations de séquence de la flagelline se situent dans sa portion centrale, en effet, les extrémités sont hautement conservées.

Pour caractériser les souches non-mobiles (NM), Fields *et al.* (1997) ont développé une PCR couplée au profil de restriction. Ce test permettait d'identifier et de caractériser le gène *fliC* codant l'antigène H chez *E. coli*. La séquence complète de ce gène était amplifiée par PCR, puis l'amplifiat était digéré par l'enzyme de restriction *RsaI* et analysé après électrophorèse. Deux cent quatre vingt souches de *E. coli* appartenant aux sérotypes O157:H7 et O157:NM, des souches possédant l'antigène H7 mais un antigène O autre que O157 et des souches appartenant à tous les autres groupes d'antigènes flagellaires, ont été testées. Un profil de restriction unique (profil A avec 3 bandes) a été identifié pour les O157:H7, les O157:NM producteurs de vérotoxines et 16 des 18 isolats de O55:H7 utilisés. Les souches non-O157 possédant H7 avaient un profil qui différait du profil A par au moins une des 3 bandes. Une importante variété de profils a été mise en évidence parmi les souches appartenant aux autres groupes d'antigènes flagellaires, mais aucune ne possédait le profil A. Treize des 15 souches non-mobiles ne possédaient pas le profil A mais des profils d'autres groupes flagellaires. La PCR couplée au profil de restriction en combinaison avec la détermination du sérotype O pourrait donc être très utile pour identifier *E. coli* O157:H7 et des souches voisines n'exprimant pas d'antigène flagellaire immunogène.

Quant aux autres antigènes flagellaires (y compris H7), Machado *et al.* (2000) ont publié un système d'amorces caractérisant les gènes *fliC* codant la flagelline de 48 types H différents par restriction avec *HhaI* de la séquence amplifiée (0,9 à 2,6 kpb). Une base de données de 62 profils a été construite à partir de 182 souches permettant de déduire les types flagellaires H à partir des types F (*fliC-HhaI*). Un schéma d'identification automatique par ordinateur a été proposé. Les souches immobiles pouvaient également être identifiées par leur type F.

➤ **Détection du gène *rfb***

La biosynthèse de l'antigène O157, correspondant au lipopolysaccharide, nécessite l'intervention de plusieurs enzymes. Les gènes *rfb* codant ces enzymes se situent sur un locus déterminé du chromosome bactérien.

Desmarchelier *et al.* (1998) ont utilisé une paire d'amorces permettant d'amplifier le gène *rfbE*. Tous les STEC des sérotypes O157:H7 et O157:NM ont donné un signal à 497 pb alors que toutes les autres souches de *E. coli* et les 6 autres espèces bactériennes testées n'ont donné aucune réponse. Parmi ces 6 espèces avait été incluse *Salmonella* Angoda, qui donne une agglutination avec les anticorps anti-O157 fixés sur billes de latex. La sensibilité de cette technique était de 200 bactéries/tube PCR et pouvait descendre à 2 bactéries/tube PCR lorsque l'ADN était préalablement purifié. Dans le lait de chèvre, la sensibilité pouvait être inférieure à 1 bactérie/250 mL de lait lorsque l'ADN était préalablement purifié.

Pour augmenter la validité du test, Nagano *et al.* (1998) ont mis au point une PCR multiplex avec 2 couples d'amorces ayant pour cibles les gènes *rfbE*, *fliC*, et un couple d'amorces pour *stx*₁ et *stx*₂ donnant un signal à 220 pb. Les STEC des sérotypes O157:H7 et O157:NM donnaient 3 bandes alors que les autres STEC ne montraient qu'une ou 2 bandes. Pour les non-STECS, une ou 2 bandes étaient obtenues avec les sérotypes O157:H7 et O18:H7 alors que les autres ne montraient aucune réponse. La sensibilité de cette méthode était de 3 000 bactéries/tube PCR. L'avantage de cette technique est de pouvoir différencier non seulement *E. coli* O157:H7/NM des autres STEC mais également les souches O157:H7 productrices de vérotoxines des souches O157:H7 non-productrices de vérotoxines. Cette différenciation permet d'apprécier le caractère dangereux des aliments contaminés par ces souches.

Pour tous les antigènes O, un système de profils de restriction obtenus par amplification de la région *rfb* de *E. coli* (produit amplifié variant de 1,7 à 20 kpb) et restriction par *MbolI* a été décrit par Coimbra *et al.* (2000). Ce système de PCR-restriction a fourni, sans l'aide de sérums et à partir de 148 sérogroupes, 147 profils R qui sont le départ d'une base de données. Cette méthode pourra se révéler être plus performante que la sérotypie puisque 100 % des souches sont typables par cette méthode.

1.3 Particularités biochimiques des STEC non-O157

Les STEC non-O157 n'ont pas les caractéristiques biochimiques communes rendant possible l'utilisation d'un milieu d'isolement particulier. Ces souches de même que les souches *E. coli* O157:H7 fermentant le sorbitol, ne seront pas repérées sur SMAC ; ce milieu est donc inadapté. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose "entérohémolysine". La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de moutons lavés, additionnés d'ions Ca²⁺ (Beutin *et al.*, 1989). Mais il y a des limites à cette méthode. En effet, les colonies présentant une hémolyse caractéristique doivent toutes être confirmées STEC (mise en évidence du gène codant les vérotoxines) (Beutin *et al.*, 1996). D'autre part, une proportion de STEC non-O157 et STEC O157 fermentant le sorbitol, peuvent ne pas produire l'entérohémolysine et ne seront pas détectées sur gélose au sang (Bielaszewska *et al.*, 1998). Enfin la présence d'un grand nombre de souches non STEC produisant une hémolysine peut gêner le repérage des colonies suspectes sur gélose au sang.

Les colonies (STEC) suspectes obtenues sur gélose au sang peuvent être confirmées par la recherche des gènes *stx* codant les vérotoxines. Cette recherche se fait par PCR. (voir Question n°26). Le sérotypage des souches peut être réalisé au Centre européen de référence : Statens Serum Institute de Copenhague.

Ainsi les méthodes biochimiques de détection de *E. coli* O157:H7 sont intéressantes et fondamentales. Mais elles sont inadaptées pour la détection des STEC non-O157 et des souches "mutantes" de *E. coli* O157:H7.

2 Tests immunologiques de détection des STEC dans l'aliment

2.1 Tests immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 ?

Ces tests sont nombreux, mais compte-tenu de leur sensibilité, ils doivent être précédés d'une phase d'enrichissement (Tableau 10). En effet, le fait que la dose infectieuse de *E. coli* soit considérée comme basse, a obligé les chercheurs à développer de nombreux milieux d'enrichissement pour permettre aux cellules bactériennes de se multiplier jusqu'à des niveaux détectables (Taylor, 1990; USDA, 1993; Weagant *et al.*, 1994). Citons notamment une modification du bouillon trypticase soja additionné de novobiocine ou d'acriflavine pour réduire le nombre d'organismes à Gram positif. Un autre milieu d'enrichissement consiste en de l'eau peptonée tamponnée additionnée de vancomycine et de céfixime pour supprimer la croissance des bactéries à Gram négatif comme *Aeromonas sp.* et *Proteus sp.*

Il existe actuellement sur le marché un grand nombre de tests permettant la détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment. Ces systèmes comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés.

2.1.1 Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA

Ces méthodes immunologiques donnent un résultat en 15 minutes (test "une étape", immuno-chromatographique) ou en 2 heures (système ELISA microplaques) après une phase d'enrichissement (le plus souvent d'une durée de 24 heures). Par conséquent la durée totale de l'analyse est d'un jour en comparaison des trois jours nécessaires pour la méthode conventionnelle.

La préparation de l'échantillon et les phases d'enrichissement varient d'un kit immunologique à l'autre, mais s'inspirent souvent des recommandations formulées par la FDA (Food and Drug Administration).

Les méthodes immunologiques en "une étape" sont très employées par les industriels du fait de leur rapidité d'exécution et de leur simplicité. En effet les étapes de lavage-rinçage et d'addition de plusieurs réactifs ne sont pas nécessaires avec ces kits. Le dispositif consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques de *E. coli* O157:H7 (i.e. O157 et éventuellement H7), un puits pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle.

Une aliquote du bouillon d'enrichissement (généralement 100 µl) est placée dans le puits destiné à l'échantillon alimentaire, puis diffuse le long de la membrane jusqu'à la zone test contenant l'anticorps anti-O157. L'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test après 10 à 20 minutes indique un résultat positif signifiant la présence probable de *E. coli* O157 dans l'aliment.

Pour les systèmes ELISA, les anticorps spécifiques de *E. coli* O157 sont fixés au fond des puits de microplaques. L'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposée dans ces puits. Après incubation et une série de lavages, un anticorps "révéléateur" anti-O157 est ajouté pour détecter le couple anticorps-bactéries. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique.

La sensibilité de ces tests est en moyenne de 10^5 *E. coli* O157/mL de bouillon d'enrichissement.

2.1.2 Systèmes automatisés

L'éventail des méthodes immunologiques complètement automatisées est beaucoup plus restreint.

Le VIDAS ECO (BioMérieux) consiste en un kit qui permet la réalisation entièrement automatisée après une phase d'enrichissement de 24 heures. Le principe de ce kit est celui d'un système ELISA. Il est composé de 2 éléments prêts à l'emploi : un cône à usage unique, servant à la fois de phase solide et de système de pipettage et dont la face interne est recouverte d'anticorps anti-O157, et une barrette contenant les solutions de lavage et de révélation. Une aliquote de 500 µl de bouillon d'enrichissement placé dans la barrette subit des cycles d'aspiration-refoulement. Les bactéries *E. coli* O157:H7 présentes dans ce bouillon sont captées par les anticorps du cône. Les éléments restés libres sont éliminés grâce à plusieurs lavages. En phase finale, des anticorps révélateurs anti-O157 sont aspirés dans le cône. Ces anticorps sont marqués à la phosphatase alcaline, enzyme qui permet la révélation colorimétrique interprétée par l'appareil VIDAS. L'automate peut réaliser jusqu'à 30 analyses simultanément. L'investissement nécessaire dans l'automate doit être contrebalancé par la main-d'œuvre réduite et la possibilité de réaliser de nombreuses autres recherches de pathogènes et/ou toxines avec cet automate (exemple : *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, entérotoxine staphylococcique).

Ce système automatisé permet l'immunocapture et également la détection des pathogènes.

2.1.3 Résultats et interprétation

L'ensemble des systèmes décrits permet aux industriels agroalimentaires un contrôle "présomptif" de la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments :

- en cas de réponse négative du test, et dès lors que la phase d'enrichissement de l'échantillon a bien été conduite, l'industriel peut considérer que la prise d'essai testée ne contient pas de *E. coli* O157:H7.
- par contre si le kit utilisé donne une réponse positive, quelle doit être l'interprétation de ce résultat positif ?

Les kits décrits précédemment ne recherchent que l'antigène somatique O157 (parfois associé à l'antigène H7). Même les systèmes qui affichent une spécificité totale pour *E. coli* O157:H7 donnent en fait des résultats positifs pour des *E. coli* O157 non-H7.

Donc un résultat positif d'un de ces tests immunologiques signe seulement la présence de l'antigène cible (le plus souvent, il s'agit de l'antigène somatique O157). Or les réactions immunologiques croisées avec des espèces bactériennes autres que *E. coli* ne sont pas rares. En effet, l'antisérum polyclonal O157 réagit également avec *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica* séro-groupe O9, *Salmonella* groupe N et *Pseudomonas maltophilia* 555. L'épitope commun à toutes ces bactéries responsables des réactions croisées est le sucre 4-amino-4,6 didésoxy-D-mannose présent sur le lipopolysaccharide.

Il faut donc confirmer ce résultat en isolant la bactérie à l'origine du message positif et identifier cette bactérie. Cette confirmation prend au moins 3 jours.

Tableau 10 : Kits immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment (Vernozy-Rozand et al, 2002)

TEST	FABRICANT	ANTIGÈNE(S) CIBLE(S)	SYSTEME DE REVELATION	FORMAT	VALIDATION
EHEK-Tek™	Organon Teknika	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	Health Canada Method MRLP-91
Tecra™ E.C. O157 VIA	Bioenterprises Pty Ltd	O157	Colorimétrique	Microplaque	
Assurance™ EHEC EIA	BioControl Systems Inc.	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	AOAC Official Method 996.10
PATH-STIK <i>E. coli</i> O157	Celsis-Lumac	O157	Colorimétrique	Dip-stick	
VIP™EHEC	BioControl Systems Inc.	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	AOAC Official Method 996.09
Transia card <i>E. coli</i> O157	Diffchamb	O157	Colorimétrique	1 étape	
REVEAL™ <i>E. coli</i> O157:H7	Neogen	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
ImmunoCard Statl <i>E. coli</i> O157:H7	Meridian Diagnostics	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	AOAC Performance Tested
Biocard EHEC	ANI Biotech OY	O157	Colorimétrique	1 étape	
Singlepath™ <i>E. coli</i> O157:H7	Merck Ltd	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
VIDAS <i>E. coli</i> O157	BioMérieux	O157	Fluorescent	Automatisé	AFNOR 12/08-07/00
EiaFoss <i>E. coli</i> O157	Foss Electric A/S	O157	Fluorescent	Automatisé	

2.1.4 Tests immunologiques validés AFNOR de détection des *E. coli* O157:H7

Les deux méthodes, validées AFNOR existantes, intègrent une phase d'immunoconcentration qui permet d'extraire et/ou de concentrer la bactérie cible du bouillon d'enrichissement. En effet, un isolement direct sur une gélose à partir du bouillon d'enrichissement donnerait des boîtes trop chargées pour lesquelles le repérage des colonies suspectes « Sorbitol négatives » serait difficile. Différentes techniques "d'immunoconcentration" sont actuellement disponibles. A la différence des systèmes décrits précédemment, ces méthodes sont des outils qui vont optimiser l'étape d'isolement de la bactérie cible sur une gélose spécifique en la séparant de la matrice alimentaire et du reste de la microflore.

Parmi ces méthodes d'immunoconcentration, on trouve l'immunoséparation magnétique (IMS) et l'immunoconcentration automatique (ICE) permise par le VIDAS (Tableau 11).

Tableau 11 : Kit d'immunoconcentration de *E. coli* O157 dans l'aliment (Vernozy-Rozand et al, 2002)

FABRICANT	TEST	FORMAT	ANTIGENE CIBLE	VALIDATION
Dynal Ltd (UK)	Dynabeads® anti <i>E. coli</i> O157 (IMS)	Billes paramagnétiques	O157	AFNOR DYN 16/2-0696 ISO EN 16654
Tecra Ltd (UK)	<i>E. coli</i> O157 Immunocapture system (ICS)	Dip-stick	O157	non
BioMérieux	VIDAS Immunoconcentration <i>E. coli</i> O157 (ECO)	Automate	O157	AFNOR 12/08-07/00

En France, les deux méthodes validées AFNOR de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment utilisent (Figure 13 et Figure 14) :

- soit l'IMS : cette méthode est aussi la norme ISO EN 16654
- soit le système VIDAS ECO pour la détection de l'antigène somatique O157.

Lors d'une réponse positive pour le système VIDAS-ECO, une immunoconcentration est réalisée avec le système VIDAS ICE. Ce kit VIDAS ICE est composé des mêmes composants que le kit VIDAS ECO (cône et barrette). Le cône est recouvert d'anticorps anti-O157 qui permettent de capturer les bactéries cibles. Ces bactéries sont ensuite relarguées dans le premier puits de la barrette sous forme d'un immunoconcentrat qui est ensuite isolé sur des géloses spécifiques ; les colonies suspectes font l'objet de confirmation (agglutination latex O157, identification de l'espèce, recherche de l'antigène H7, production de vérotoxine).

La séparation immuno-magnétique (IMS) reprise dans la norme ISO EN 16654, est une méthode qui utilise des particules paramagnétiques couvertes d'anticorps spécifiques de l'organisme cible, ajoutées à l'échantillon d'aliment à analyser. L'organisme cible est capturé à la surface des particules magnétiques et l'ensemble est retiré de l'échantillon par application d'un aimant. Les organismes cibles sont ensuite séparés par centrifugation des débris alimentaires et des micro-organismes qui peuvent interférer avec les différents systèmes de détection. En rediluant les cellules cibles ainsi isolées dans un volume inférieur à celui duquel elles proviennent, on obtient un effet de concentration des cellules bactériennes et on augmente ainsi la sensibilité des systèmes de détection. Après enrichissement, les billes sont généralement mises en culture sur des milieux sélectifs.

➤ **Protocole de recherche de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment (présentation des deux méthodes validées AFNOR)**

Les industriels de l'agroalimentaire ont à leur disposition de nombreux outils immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments. Les différents tests disponibles, même si certains fabricants prétendent que leurs tests soient spécifiques de *E. coli* O157:H7, ne sont que des tests présomptifs. Une préférence devra être accordée dans certains cas à des tests validés officiellement (validation AFNOR ou autres).

Ainsi, un kit immunologique de détection de *E. coli* O157:H7 qui donne une réponse positive, n'apporte qu'une information qui doit être confirmée en passant nécessairement par l'isolement et l'identification de la souche bactérienne à l'origine du message immunologique positif. Cette confirmation est nécessaire avant de prendre toute décision quant au devenir du lot suspect (Figure 13 et Figure 14). L'isolement des souches est grandement facilité par les méthodes d'immunoconcentration des *E. coli* O157:H7.

Remarque : Les différentes étapes de détection et de confirmation de *E. coli* O157:H7 dans l'eau, proposée par le Public Health Laboratory Service (Royaume Uni) sont les suivantes : concentration sur filtre, incubation dans un bouillon d'enrichissement sélectif (bouillon trypticase soja modifié pendant 5 à 6 h ou 22 h à 41,5°C), isolement sur milieux sélectifs après une double immunoséparation magnétique (billes Dynabeads *E. coli* O157:H7). Les boîtes de CT SMAC sont incubées à 37°C pendant 22 heures puis, une confirmation des colonies suspectes est effectuée.

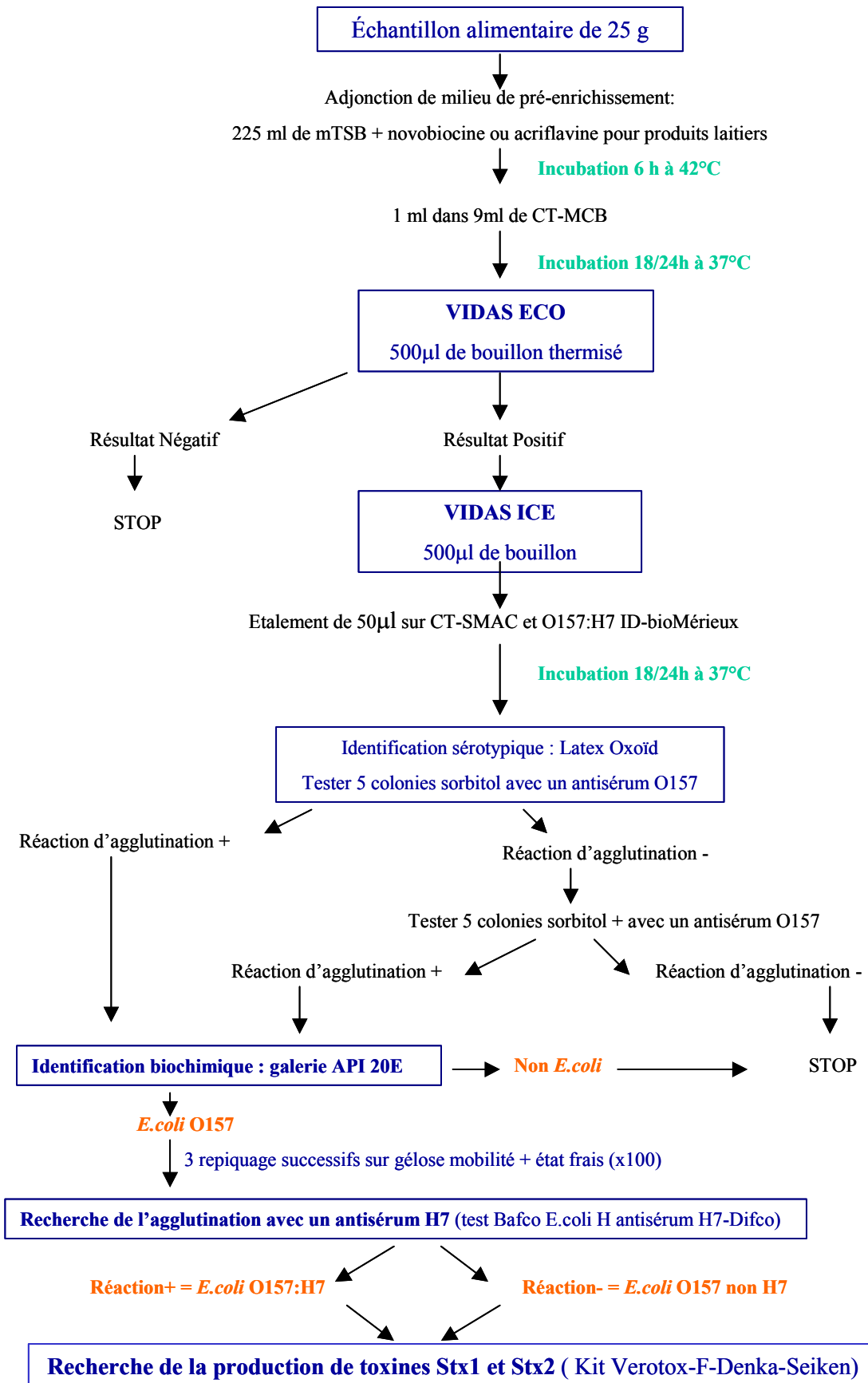


Figure 13 : Protocole de recherche de *E. coli* O157 dans l'aliment : méthode VIDAS

Préparation de l'échantillon

25g d'échantillon + 225ml mTSB (préchauffé 37°C)

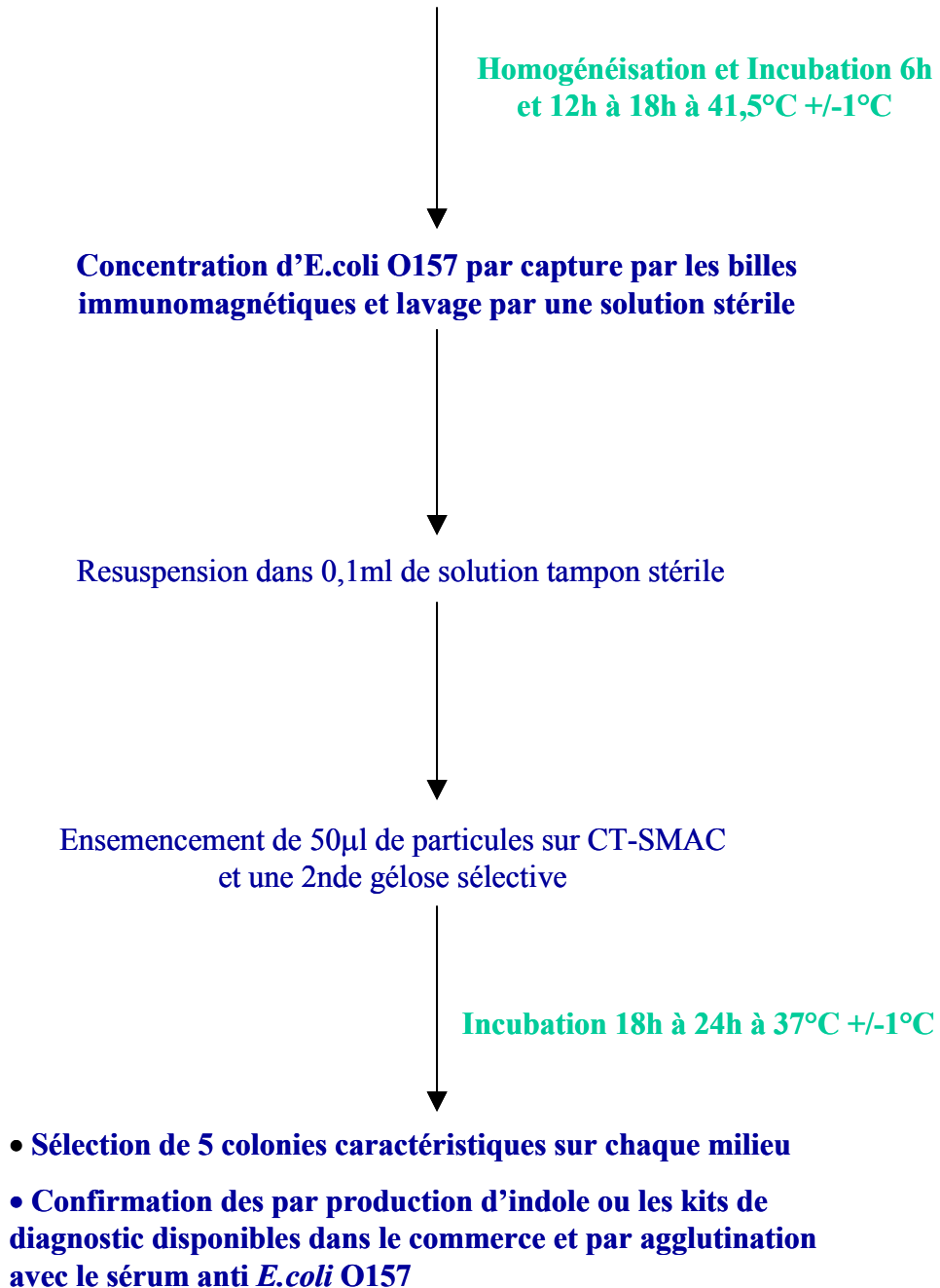


Figure 14 : Mode opératoire IMS (Norme ISO EN-16654)

2.2 Tests immunologiques de détection des STEC non-O157

Ces tests sont des alternatives à la méthode de référence de recherche des vérotoxines. Celle-ci est fondée sur la mise en évidence du pouvoir cytopathologique des vérotoxines sur les lignées cellulaires Vero (Richardson *et al.*, 1988). Ainsi peuvent être testés des échantillons fécaux, des cultures cellulaires et des aliments (Rowe *et al.*, 1994). Les colonies, déjà isolées, sont incubées en bouillon trypticase soja ; puis les cultures, après filtration, sont ajoutées à la lignée cellulaire Vero. Ces cellules prennent une forme ronde et se détachent les unes des autres en présence de vérotoxines. Dans des études récentes, la croissance des STEC dans des milieux dépourvus de fer permet la production augmentée des Stx1 mais pas des Stx2 (Thomas *et al.*, 1993). Pour les tests de routine, les concentrations de vérotoxines obtenues dans les bouillons décrits plus haut sont suffisantes. Une grande quantité des vérotoxines n'est pas libérée dans les milieux mais reste liée à la bactérie. Elle peut être relarguée par une sonication, par l'utilisation d'une presse de French ou par un traitement à la polymyxine. Ces techniques ont été utilisées pour la préparation de grandes quantités de vérotoxines (Proulx *et al.*, 1992). Du fait d'un seuil de sensibilité très bas, nécessaire à la détection des vérotoxines libres dans un milieu, il n'est pas rare que celles-ci soient présentes sans que l'on parvienne à isoler la bactérie. A l'inverse aucun STEC ne peut-être trouvé en l'absence de vérotoxines libres. (Igarashi *et al.*, 1987; Proulx *et al.*, 1992). Pour confirmer que l'effet cytopathogène exercé sur les cellules Vero est effectivement dû aux vérotoxines, il faut réaliser des tests de neutralisation en utilisant des anticorps dirigés contre les Stx1 et les Stx2 (Scotland *et al.*, 1988). La thermostabilité de la toxine devra également être confirmée après chauffage des échantillons à 100 °C pendant 15 minutes.

Quelques techniques ELISA permettant la détection des vérotoxines ont été décrites (Beutin *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 1992; Keene *et al.*, 1993). Les systèmes permettant la fixation des vérotoxines sont variés : des glycolipides contenant un composé terminal D-Gal-(1->4)-D-Gal, le céramide globotriosyl (Gb3), lyso-Gb3 et le liquide des vésicules hydatiques provenant de moutons infectés par *Echinococcus granulosus*. Dans d'autres études, les anticorps monoclonaux anti-vérotoxines ont été utilisés. En général, ces tests sont moins performants, parce que moins sensibles, que le test utilisant les cellules Vero. En outre, comme ces toxines montrent des antigénicités variables, une grande vigilance doit exister pour le choix des réactifs lorsque l'on se propose de détecter toutes les vérotoxines dans un échantillon (Smith *et al.*, 1993). Depuis peu quelques kits ont été commercialisés, permettant la détection des vérotoxines dans les matières fécales. Par exemple le « Premier EHEC test » (Meridian Diagnostic Inc, USA) a fait l'objet de nombreuses évaluations (Kehl *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1998), concluant toutes à la bonne sensibilité et spécificité de cette méthode, qui est désormais utilisée en routine dans de nombreux laboratoires ne disposant pas de matériel de biologie moléculaire.

La capacité du STEC-RPLA, Denka Seiken, (Japon), de détecter et d'identifier Stx1 et Stx2 extraites par polymyxine d'un surnageant de culture pure de STEC est étroitement corrélée à la présence des gènes codant pour ces vérotoxines (Beutin *et al.*, 1996). Les conclusions sont également favorables pour le VEROTOX-F Denka Seiken (Japon), qui a été comparé au test de cytotoxicité sur cellules Vero par Karmali (1999).

3 Méthodes génétiques de détection des STEC dans les aliments

Ces méthodes sont la plupart du temps basées sur la recherche des gènes *stx* codant les vérotoxines par PCR (Bouvet and Vernozzy-Rozand, 2000). Les amorces conseillées sont décrites par Lin *et al.* (1993). Le premier système a été mis au point par Karch et Meyer (1989) avec des amorces "dégénérées", c'est-à-dire un mélange de plusieurs amorces permettant d'amplifier *stx*₁ et *stx*₂. Les amplifiats obtenus étaient identifiés par hybridation avec des sondes spécifiques complémentaires d'une partie de la séquence amplifiée. Il était alors possible d'identifier les séquences de *stx*₁ et *stx*₂ mais les variants de *stx*₂ ne pouvaient pas être différenciés de *stx*₂.

Pour détecter tous les types de STEC isolés chez l'animal ou dans les aliments, Read *et al.* (1992) ont développé une PCR avec une paire d'amorces ayant pour cible une séquence conservée des gènes *stx*₁, *stx*₂ et *stx*_E. Plusieurs matrices (viande de bœuf, viande de porc, lait de chèvre, fèces de bœuf et fèces de porc) contenant différentes souches de STEC (233 souches) de *E. coli* non vérotoxigènes (72 souches) et d'autres bactéries (76 souches) ont été testées. Toutes les souches de STEC, appartenant à 50 sérotypes différents, ont pu être détectées avec cette méthode. *Shigella dysenteriae* type 1 était la seule autre bactérie détectée. La sensibilité de cette méthode était de 1 pg d'ADN ou 17 ufc. Chen *et al.* (1998) ont utilisé les mêmes amorces pour réaliser un système de détection et de quantification des STEC dans les aliments. Ce

système comportait 2 étapes : une amplification asymétrique (une des amorces était en excès par rapport à l'autre) avec la paire d'amorces mise au point par Read *et al.* (1992), puis une "demi" PCR nichée (les amorces se fixent à l'intérieur du segment amplifié par les premières amorces) avec une amorce double-brin fluorescente. Cette deuxième étape d'amplification entraînait la dissociation de l'amorce marquée, au fur et à mesure de son utilisation, et par conséquent la diminution du signal de fluorescence. Cette perte de signal était ainsi proportionnelle à la quantité d'amorce incorporée dans les produits finaux d'amplification. Elle pouvait être mesurée cycle après cycle et utilisée pour la quantification de la cible initiale.

Tous les protocoles de PCR appliqués sur les aliments se heurtent au problème lié à la présence d'inhibiteurs de la polymérase. Pour éviter cela, il est alors nécessaire d'isoler les bactéries ou d'extraire leur ADN (Chen *et al.*, 1998; Gilgen *et al.*, 1998). Récemment, plusieurs protocoles ont été mis au point directement à partir des aliments. Begum et Jackson (1995), ont dilué 1 000 fois les échantillons de viande de bœuf afin de réduire la concentration des composés inhibant la polymérase. Avec cette technique, même si un enrichissement de 6 heures était indispensable pour 6 des échantillons, il était alors possible de détecter 30 STEC/mL de bouillon de culture. Afin de contrôler les agents inhibiteurs de la PCR (protéases, agents chélateurs du magnésium, sels,...) qui peuvent être présents dans des échantillons complexes comme les aliments ou les matières fécales, il est indispensable d'utiliser des contrôles internes d'inhibition. Ainsi, le test de PCR-ELISA développé par Fach *et al.* (2001) utilise un contrôle interne d'inhibition qui est co-amplifié avec les gènes *stx* et dont la détection s'effectue aussi par hybridation sandwich sur format microplaque. Cette approche permet de contrôler la faisabilité de la réaction PCR et d'éviter les « faux négatifs » dus aux effets de la matrice.

Masters *et al.* (1994) ont étudié la corrélation entre la viabilité, quantifiée par le dénombrement bactérien sur milieu gélosé et la détectabilité par PCR de bactéries soumises à différents stress. Un traitement par l'acide ou l'eau oxygénée, entraînait la perte du signal par PCR, juste après la disparition de la viabilité. Par opposition, un fort signal en PCR était obtenu avec des cellules tuées par privation de substances nutritives ou déshydratation. La détection par PCR n'était que très peu affectée par l'exposition à des températures allant jusqu'à 100 °C. Et même les cellules autoclavées (121 °C pendant 15 minutes) pouvaient être détectées par cette méthode. Ces résultats illustrent le fait qu'il n'existe pas de corrélation évidente entre viabilité et détectabilité par PCR.

L'influence d'un stress par le froid sur la durée de l'enrichissement, avant détection par PCR, de STEC volontairement ensemencés dans de la viande de bœuf, a été étudiée par Uyttendaele *et al.* (1998). Des temps d'incubation de 6 et 9 heures de 1 à 10 ufc/g et de 1 à 10 ufc/25g respectivement étaient suffisants lorsque l'analyse était réalisée immédiatement après ensemencement (pas de période de réfrigération ou de congélation). Quand les bactéries étaient exposées au froid (+4 °C ou -20 °C), une période d'enrichissement de 24 heures était nécessaire. Dans ces conditions, un enrichissement plus court de 9 heures réduisait la sensibilité de la PCR à 80 ufc/g. En conclusion, un enrichissement de 24 heures d'un échantillon de viande de bœuf naturellement contaminée, serait optimal pour une détection ultérieure des STEC par PCR.

Plusieurs auteurs ont décrits des systèmes de détection des STEC faisant appel aux techniques récentes de PCR en temps réel. De façon générale, la PCR en temps réel permet de réaliser l'amplification et l'identification du produit amplifié simultanément (suivi en temps réel de la réaction). Ces méthodes présentent de plus l'avantage d'être quantitatives, sensibles, spécifiques et rapides. Les mesures des réactions d'amplification sont toujours basées sur le suivi de l'émission d'un fluorophore mais différents formats réactionnels (SYBRGreen, molecular beacons, sondes d'hybridation, sondes de type Taqman) sont utilisables.

Les premiers systèmes moléculaires faisant appel aux principes de la PCR en temps réel (sondes marquées avec des fluorophores) n'utilisaient pas des systèmes intégrés de lecture de fluorescence en temps réel. Ainsi, Oberst *et al.* (1998) ont décrit un système pour l'identification des STEC O157:H7 basé sur l'amplification de l'extrémité 5' du gène *eae* utilisant les amorces précédemment décrites en PCR classique par Meng *et al.* (1996) et une sonde de type Taqman (Il est à noter que l'amplification de cette région ne permet d'obtenir qu'une identification présomptive de STEC O157 puisque, comme observé en PCR classique par Meng *et al.* (1996), elle génère des réactions croisées avec les souches O55 de *E. coli*). Sharma *et al.* (1999) ont décrit trois sets de primers et trois sondes de type Taqman pour la détection des gènes *stx*₁, *stx*₂, *eae*. McKillip *et al.* (2000) ont rapporté un modèle moléculaire utilisant un couple de primer et une sonde « molecular beacon » pour la détection de *stx*₂. Ce modèle a été validé par l'analyse d'échantillons de lait contaminé par *E. coli* O157:H7.

Plus récemment, des auteurs ont publié des travaux pour la détection des STEC par des méthodes de PCR en temps réel qui utilisent les appareils qui permettent l'amplification et la mesure de fluorescence simultanément (LightCycler, ABIprism 7700, SmartCycler...). Ainsi, un modèle de PCR en temps réel a été décrit par Bélanger *et al.* (2002) pour la détection des gènes *stx*₁ et *stx*₂ des STEC. Cette méthode utilise deux couples de primers qui amplifient respectivement tous les variants des gènes *stx*₁ et de *stx*₂. Ces couples de primers ont été utilisés en multiplex avec deux sondes internes (« molecular beacons ») marquées avec deux fluorophores différents pour la détection spécifique des deux types d'amplicons. Cette méthode très rapide (1 heure) a été testée sur 23 souches de STEC et 38 extraits fécaux de patients et s'est révélée simple, sensible et spécifique. Un système analogue de PCR en temps réel permettant de détecter et identifier les gènes *stx*₁ et *stx*₂ a été décrit par Bellin *et al.* (2001). Il utilise aussi, en multiplex, deux couples de primers qui amplifient respectivement des portions des gènes *stx*₁ et *stx*₂, mais les sondes internes sont des sondes d'hybridation. Ces auteurs indiquent la possibilité d'identifier les variants de type *stx*_{2e} grâce à l'analyse des courbes de fusion des produits amplifiés. Cette méthode très rapide (45 minutes) a été testée sur 48 STEC et 37 souches bactériennes non STEC. Pour la détection des *E. coli* de sérotype O157, Fortin *et al.* (2001) ont décrit un système de PCR en temps réel basé sur la détection du gène *rfb* (codant pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse de l'antigène somatique O). Ce modèle utilise une sonde « molecular beacon ». Il a permis la détection de tous les *E. coli* O157 testés et a été validé par contamination artificielle de lait et de jus de pommes. Des systèmes de PCR en temps réel utilisant des sondes de type Taqman pour la détection des facteurs de virulence de souches de *E. coli* isolées de porcs ont également été décrits par Frydendahl *et al.* (2001). Cette étude décrit des modèles moléculaires pour la détection des facteurs de colonisation (F4, F5, F6, F18, F41, intimine) des toxines thermostables (STa, STb, EAST1), thermolabiles (LT), de la vérotoxine Stx_{2e}.

Deux kits de détection de *E. coli* O157:H7 sont actuellement commercialisés. Ces 2 kits utilisent la PCR comme technique de détection (les amorces ne sont pas révélées par les fabricants) et permettent d'obtenir un résultat en 24 heures :

- Le kit BAX® for screening/*E. coli* O157:H7 (Qualicon, Inc. – USA) permet d'obtenir un taux de détection de *E. coli* O157:H7 égal à 96,5 %, contre un taux de 39 % pour les méthodes de culture et de 71,5 % pour la méthode d'immunodiffusion (Johnson *et al.*, 1998). Ainsi après enrichissement en milieu EC modifié, d'échantillons de jus de fruits (orange, pomme et carotte) volontairement contaminés, ce système permet de détecter moins de 5 ufc/25 mL (Kirke White *et al.*, 1997).
- Le kit Probelia™ PCR System-*E. coli* O157:H7 (BioControl Systems, Inc. – USA) repose sur l'amplification génique par PCR, suivie de l'hybridation « sandwich » des fragments d'ADN amplifiés. Ce test utilise des amorces et des sondes ADN spécifiques de *E. coli* O157:H7 ainsi qu'un système de révélation colorimétrique sur plaque de microtitration. Un ADN synthétique, appelé "contrôle interne", est ajouté à chaque réaction d'amplification. La détection du contrôle interne amplifié s'effectue sur une plaque de microtitration spécifique à celui-ci. Un échantillon est considéré comme négatif si la valeur de l'absorbance obtenue est inférieure ou égale à la valeur limite établie pour l'essai et a été interprétée en fonction des résultats obtenus pour le contrôle négatif. Un échantillon est considéré comme positif si la valeur de l'absorbance obtenue est supérieure à la valeur limite établie pour l'essai. La spécificité a été évaluée avec des cultures pures de 98 STEC (dont 57 O157:H7 et 3 O157:NM), 40 *E. coli* non STEC et 42 entérobactéries (dont *Salmonella sp.* et *Shigella sp.*). Seules les souches de *E. coli* O157:H7 et O157:NM sont détectées par cette méthode. En terme de sensibilité, ce kit permet la détection de 1 à 10 ufc/25g, après enrichissement (Coquard *et al.*, 1998).

Les méthodes génétiques ont une très grande sensibilité et une spécificité souvent supérieure à celle des méthodes immunologiques. Elles permettent donc la détection de bactéries pathogènes présentes en très faible nombre dans l'aliment. Elles permettent également la détection des facteurs de virulence dont l'association est un pré-requis pour envisager le caractère éventuellement dangereux d'un aliment.

Les méthodes génétiques sont donc intéressantes pour détecter les *E. coli* vérotoxiques et plus particulièrement le sérotype O157:H7 dans les aliments.

Le seul frein à l'application de ces méthodes génétiques à grande échelle, notamment dans le cadre des investigations en industries agro-alimentaires, est le nécessaire investissement en matériel et en formation du personnel.

Rappelons enfin que ces différentes méthodes ne donnent qu'une réponse de type absence ou présence de l'agent pathogène. Une réponse positive devra toujours être confirmée par un isolement de la bactérie avec recours indispensable aux méthodes "traditionnelles".

4 Limites de ces méthodes

4.1 Dénombrement

Lors d'études concernant la résistance de *E. coli* O157:H7 à différents facteurs, le choix des conditions de recouvrement influence les résultats. En effet, si ces conditions ne permettent pas une revivification optimale des cellules bactériennes, les effets bactéricides des traitements appliqués peuvent être surestimés. Ainsi, le milieu Modified Sorbitol Mac Conkey Agar (MSMA), largement utilisé pour le dénombrement des *E. coli* O157:H7, a montré ses limites pour le recouvrement de cellules stressées par la congélation (Abdul-Raouf *et al.*, 1993b; Cooner and Hall, 1994; Harrisson *et al.*, 1998; Rocelle *et al.*, 1995), le chauffage, le pH, de hautes concentrations en NaCl, ou encore par l'acidification et le séchage lors de la fermentation de produits carnés.

Par exemple, le milieu Modified Eosin Methylene Blue agar (MEMB) permet un meilleur recouvrement des cellules stressées et montre des taux de recouvrement similaires à ceux obtenus sur milieux nutritifs non sélectifs (Trypticase soja).

Blackburn et McCarthy (2000) ont montré que des méthodes utilisant directement un enrichissement sélectif avec ou sans élévation de la température, donnaient des résultats faussement négatifs et ont préconisé l'incorporation d'un milieu de pré-enrichissement non sélectif qui augmente le taux de détection par plus de 10 fois.

Kang (2002) propose l'utilisation d'une membrane-filtre pour permettre à des cellules stressées par la chaleur de se revivifier sur un milieu non sélectif avant d'être soumises à la diffusion d'agents sélectifs.

Aucune étude n'a été entreprise à ce jour pour le dénombrement des STEC.

4.2 Influence du stress et des formes Viables Non Cultivables (VNC)

De nombreux auteurs considèrent aujourd'hui que les STEC peuvent entrer dans une forme viable non cultivable suite à des stress où interviennent des modifications des fonctions physiologiques et notamment une division cellulaire altérée (Colwell *et al.*, 1985).

La plupart des études n'ont concerné que le seul sérotype O157:H7, avec la démonstration du passage à une forme viable non cultivable, notamment lors d'un maintien prolongé dans de l'eau (Mizunoe *et al.*, 1999; Rigsbee *et al.*, 1997; Wang and Doyle, 1998). Plus particulièrement Rigsbee *et al.* (1997) ont montré que 3 souches différentes de *E. coli* O157:H7 devenaient non cultivables mais viables au bout de 70 jours dans de l'eau salée (pH 7,4, t° 5°C). De même 5 souches de *E. coli* O157:H7 deviennent également non cultivables dans un réservoir d'eau au bout de 77 jours et dans l'eau d'un lac au bout de 50 voire 70 jours à 25°C (Wang and Doyle, 1998). Des souches de *E. coli* O157:H7, mises en suspension dans de l'eau et maintenues à 4°C, deviennent non cultivables en 21 jours selon Mizunoe *et al.* (1999).

Une épidémie impliquant du saumon fumé contaminé par *E. coli* O157:H7, est intervenue au Japon en 1998 (Asai *et al.*, 1999). Moins de deux bactéries par gramme ont été dénombrées, ce qui a amené certains chercheurs à supposer que les souches étaient entrées sous forme VNC. Cette hypothèse est étayée par Makino *et al.* (2000b) qui ont démontré le passage sous forme VNC après une exposition des souches O157:H7 à des concentrations importantes en NaCl et la revivification de ces souches lorsque les conditions redevenaient normales. Selon eux, si ce changement intervient dans l'aliment, il serait alors difficile d'isoler les bactéries VNC en utilisant les méthodes de détection habituelles. En outre, bien que des milieux sélectifs supplémentés avec des sels biliaires soient utilisés couramment pour la détection des Entérobactéries, de tels milieux n'étaient pas adaptés pour la détection, ni de cellules O157:H7 en VNC, ni des cellules résistantes au NaCl isolées d'aliments salés (Makino *et al.*, 2000b).

Un grand nombre de méthodes de culture permet cette revivification de souches VNC. L'une d'entre elles consiste à ajouter, au milieu de culture, des agents dégradants le peroxyde comme la catalase ou le pyruvate de sodium. Ces composés permettent une protection des cellules contre le stress oxydatif (Mizunoe *et al.*, 1999).

La majeure partie des méthodes utilisées pour détecter les STEC dans les aliments utilise l'ADN comme molécule cible. Cependant, de nombreuses publications montrent que l'ADN n'est pas le meilleur indicateur de la viabilité des pathogènes du fait de sa persistance après la mort cellulaire.

L'ARNm, quant à lui, a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi la RT-PCR pourrait constituer un moyen très intéressant pour détecter rapidement les pathogènes viables (McIngvail *et al.*, 2002).

L'expression des facteurs de virulence des bactéries est affectée et régulée par de nombreux paramètres environnementaux dont les conditions de stress soumis à la bactérie. Ainsi, si l'on veut utiliser la RT-PCR comme moyen de détecter spécifiquement les bactéries, il faut choisir un ARNm cible dont l'expression est importante et dépend de ces facteurs environnementaux.

McIngvail *et al.* (2002) ont montré que la RT-PCR utilisant comme amorce l'ARNm de la Stx2 constituait un outil fiable pour détecter les STEC viables dans de la viande de bœuf haché.

Villarino *et al.* (2000) ont étudié la différenciation entre des bactéries viables et des VNC, en évaluant différentes méthodes sur l'expression de la viabilité (comme les activités métaboliques, l'intégrité cellulaire, ou la construction de matériels cellulaires) de *E. coli* K12 stressé par la chaleur ou les UV : la combinaison de l'hybridation *in situ* en fluorescence, avec des sondes d'ARN ribosomique et de l'élongation cellulaire avait la capacité de différencier la vie de la mort cellulaire. Ils proposent une définition sur la mort bactérienne comme un état irréversible où aucune croissance, élongation cellulaire ou synthèse protéique ne peuvent intervenir.

Le pouvoir pathogène des bactéries non cultivées n'est toujours pas clairement défini dans la mesure où certains auteurs (Oliver and Bockian, 1995) ont démontré leur pathogénicité alors que d'autres, bien plus nombreux, ont montré que la pathogénicité était associée systématiquement à la possibilité de culture de l'agent pathogène (Kolling and Matthews, 2001).

Makino *et al.* (2000a) ont indiqué que des souches VNC de *E. coli* O157:H7, stressées par le sel n'exprimaient pas leur pathogénicité dans l'intestin d'une souris.

Kolling et Matthews (2001) ont quant à eux testé la pathogénicité de souches de *E. coli* O157:H7 stressées expérimentalement suite à un long stockage dans de l'eau plus ou moins chlorée. L'évaluation de la virulence s'est faite en étudiant la cytotoxicité sur cellules Vero. Les souches VNC de *E. coli* O157:H7 semblent avoir perdu leur virulence.

QUESTION N°27 : QUELLES SONT LES METHODES UTILISEES ACTUELLEMENT POUR L'ISOLEMENT ET LE DENOMBREMENT DES STEC EN MEDECINE HUMAINE ?

Le diagnostic des infections à *E. coli* O157:H7 est difficile, cette bactérie étant rapidement éliminée du tube digestif. La quantité présente dans les selles reste très faible, surtout au moment du SHU (Milford *et al.*, 1990). Une étude, réalisée par Tarr *et al.* (1990), a montré qu'au cours d'un SHU, le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs.

Le diagnostic repose d'une part sur la mise en évidence dans les selles de *E. coli* O157:H7 et la détection des gènes de virulence (*stx* et *eae*) sur toute bactérie de *E. coli* potentiellement pathogène et d'autre part sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques anti-lipopolysaccharide (LPS).

1 Méthodes biochimiques et immunologiques de détection des STEC

E. coli O157:H7 étant présent en quantité parfois très faible dans les selles (<10²/g de selles), il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles (Taylor, 1990). De nombreux milieux d'enrichissement pour les *E. coli* O157:H7 ont été étudiés en microbiologie vétérinaire et animale. En médecine humaine, il est classique d'utiliser de l'eau peptonée tamponnée additionnée de vancomycine, et de céfixime pour supprimer la croissance des bactéries à Gram négatif comme *Aeromonas sp.* et *Proteus sp.*

Après croissance dans le milieu d'enrichissement, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la détection des colonies de *E. coli* O157. L'utilisation de la séparation immuno-magnétique (IMS) à l'aide de billes recouvertes d'anticorps anti-LPS de *E. coli* O157 est une méthode sensible (Safarikova and Safarik, 2001).

Pour les souches fermentant le sorbitol, la mise en évidence du caractère hémolytique sur un gélose au sang de mouton peut être une aide au diagnostic. La majorité des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur une gélose contenant des érythrocytes de moutons lavées, additionnée d'ions Ca^{2+} (Beutin *et al.*, 1989). Cependant, lorsqu'une hémolyse est observée la mise en évidence des gènes codant pour les vérotoxines est indispensable (Beutin *et al.*, 1996). De plus, une proportion de STEC non-O157 et de STEC O157 fermentant le sorbitol peut ne pas produire l'entérohémolysine et ne sera donc pas détectée sur cette gélose au sang (Bielaszewska *et al.*, 1998).

Les méthodes phénotypiques de détection de *E. coli* O157:H7 sont aisées à mettre en œuvre mais ne sont pas adaptées à la mise en évidence des souches STEC non-O157 et des souches de *E. coli* O157:H7 fermentant le sorbitol.

De nouvelles techniques, basées sur le principe d'immuno-chromatographie, utilisent un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques de *E. coli* O157:H7 (i.e. O157 et éventuellement H7). Ces méthodes, faciles à mettre en œuvre, donnent un résultat rapide (15 à 20 minutes). Cependant, elles ne détectent que les STEC de séro groupe O157 (Mackenzie *et al.*, 2000).

La technique de référence pour la recherche de vérotoxines libres sur filtrat de selles est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa (Konowalchuk *et al.*, 1977; Richardson *et al.*, 1988), spécifique si elle est neutralisée par un antisérum anti-Stx (Scotland *et al.*, 1988). Spécifique, ce test est difficile à mettre en œuvre et ne peut être utilisé qu'en laboratoire spécialisé.

Des techniques immunologiques de type ELISA, ont été développées. De valeur inégale, elles sont moins sensibles que la cytotoxicité sur cellules Vero. Cependant, quelques tests ont été commercialisés et présentent une bonne sensibilité : "Premier EHEC test" (Kehl *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1998), VTEC-RPLA (Beutin *et al.*, 1996), "VTEC-Screen "Seiken" RPLA (Beutin *et al.*, 2002).

2 Méthodes génétiques de détection des STEC

Compte-tenu de la présence en très faible quantité des STEC dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR des gènes codant pour Stx1 et Stx2 dans les selles représente une méthode très sensible. Elle constitue la méthode la plus sensible pour détecter les STEC. Cependant, elle ne peut actuellement être réalisée que par des laboratoires spécialisés.

De très nombreux systèmes PCR ont été décrits. Les gènes de virulence *stx* (*stx*₁, *stx*₂ et variants) et *eae* peuvent être recherchés séparément. Le système d'amorces développé par Lin *et al.* (1993) permet de détecter, dans un seul système, tous les variants connus des gènes *stx*. Après restriction par *HincII* du produit amplifié, Bastian *et al.* (1998) peuvent sous-typer la Shiga-toxine.

D'autres systèmes de détection de gènes de virulence peuvent être recherchés en combinaison dans des systèmes PCR multiplex (Cave *et al.*, 1994; Desmarchelier *et al.*, 1998; Gannon *et al.*, 1993; Louie *et al.*, 1994; Louie *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 1993; Paton and Paton, 1998a, 1999a, b; Pollard *et al.*, 1990).

La détection des gènes de pathogénicité est effectuée directement sur les selles après un enrichissement de 3 à 5 heures en eau peptonée. Dans le cas d'une réponse positive de la PCR, l'isolement de la bactérie responsable est indispensable pour la recherche des gènes de pathogénicité (*stx*, *eae*, *ehxA*) pour des études d'épidémiologies moléculaires (pulsotypie, rybotypie). La méthode par hybridation sur colonies avec une sonde spécifique marquée, est un bon recours pour retrouver la bactérie responsable mais nécessite davantage de temps et de personnel qualifié.

QUESTION N°28 : EXISTE-T-IL UN DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A STEC CHEZ L'HOMME ?

Deux types d'anticorps peuvent être recherchés : les anticorps anti-vérotamines et les anticorps anti-lipopolsaccharides. La recherche des anticorps anti-vérotamines n'est pas effectuée car celles-ci sont trop peu immunogènes, peu de malades développent des anticorps dirigés contre les ces vérotamines. Ces anticorps apparaissent être protecteurs contre la maladie induite chez l'animal d'expérience. Par contre dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps anti-lipopolsaccharides dont la détection est facilement réalisable (Paton and Paton, 1998a).

Le diagnostic sérologique doit être réalisé sur un sérum précoce et un sérum tardif afin d'observer une augmentation du titre des anticorps attestant de l'infection. L'importance de la réponse immunitaire est directement liée à la sévérité de la maladie.

La détection des anticorps anti-lipopolsaccharide du sérotype O157 mais aussi contre d'autres STEC (O26, O91, O103, O111, O128, et O145) est réalisée avec différentes techniques : ELISA, immunoblotting, hémagglutination (Barrett *et al.*, 1991; Bitzan and Karch, 1992; Chart, 1993; Paton and Paton, 1998a). Les 3 classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont détectables précocement, à un titre souvent très élevé, et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs (Bitzan *et al.*, 1991).

La recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic lorsque la mise en évidence directe des gènes codant pour les Stx et/ou des STEC dans les selles est impossible, en particulier pour des études épidémiologiques. La recherche des anticorps anti-LPS permet également d'identifier les autres sérotypes potentiellement STEC (Caprioli *et al.*, 1994). La plus grande prévalence des infections à *E. coli* O157:H7 par rapport à celles dues aux autres sérotypes paraît être surestimée en raison de la facilité avec laquelle ce sérotype peut être mis en évidence. Cependant, la sérologie LPS O157 a permis récemment de confirmer cette prévalence plus élevée. Plusieurs études ont en effet montré l'existence d'une infection à STEC dans 70 à 90 % des cas de SHU typiques avec une prédominance de O157 dans plus de 80 % des cas, alors que les examens de selles n'étaient positifs que dans 30 à 50 % des cas (Bitzan *et al.*, 1991; Chart, 1993; Decludt *et al.*, 2000).

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Etablir une méthode de référence nationale pour la recherche de STEC par PCR, vérifiée en terme de sensibilité et de spécificité ;
- ➔ Mise au point de sonde de détection des gènes *stx*, pour la détection *in situ* ; mise au point d'une méthode rapide de détection (moins de 2 heures) de gènes de virulence pour STEC par sondes fluorescentes et hybridation *in situ* ;
- ➔ Evaluation de l'influence des matrices alimentaires sur la détectabilité des STEC ;
- ➔ Mise au point de méthodes de détection des autres sérotypes d'intérêt et en particulier O26, O103, O111... ;
- ➔ Evaluation de la PCR en temps réel dans le cadre du diagnostic ;
- ➔ Développement et harmonisation des méthodes en médecine humaine ;
- ➔ Création d'une structure nationale pour le sérotypage des souches ;
- ➔ Appréciation de l'importance effective des formes VNC, mise au point de stratégies de détection et définition de modèle pour l'appréciation du pouvoir pathogène de ces souches ; optimisation des conditions de réactivation des bactéries stressées, pour limiter la sous-estimation.

Section G : Physiologie des STEC

Responsable de section : I. Giovannacci

Rédacteurs : B. Carpentier - I. Giovannacci

Personnalités consultées : ML. Delignette-Muller – F. Grimont – J. Raffi – C.Vernozy-Rozand

POINTS A RETENIR

- A ce jour, les données sur la physiologie des STEC concernent essentiellement le seul sérotype O157:H7. Pour les autres sérogroupes (O26, O103, O111, O145...), les données sont quasiment inexistantes.
- *E. coli* O157:H7 présente une plage de température permettant la croissance (6-46°C) analogue à celle des *E. coli* en général et ne montre pas de résistance accrue aux traitements thermiques (les recommandations pour la cuisson de steaks hachés sont, aux Etats-Unis, d'atteindre une température de 71°C à cœur et, au Royaume Uni, de maintenir une température à cœur de 70°C pendant 2 minutes).
- 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.
- D'une façon générale, hormis la résistance accrue de certaines souches de STEC à l'acidité, aucune autre résistance particulière aux traitements assainissants n'est rapportée. Toutefois, rappelons que, comme pour d'autres bactéries pathogènes :
 - l'application de chocs physiologiques (thermiques chauds ou froids, acides ou salins...) peut entraîner une résistance accrue à des traitements assainissants appliqués consécutivement aux chocs,
 - les caractéristiques physico-chimiques de la matrice alimentaire (pH, a_w , teneur en lipides...) influencent l'efficacité des traitements assainissants.
- Les cellules de *E. coli* O157:H7 lorsqu'elles adhèrent aux surfaces inertes ou aux parties intactes des végétaux, le font sous la forme de cellules isolées voire en petits agrégats. Les densités surfaciques qui sont dépendantes du milieu de culture et du support utilisé atteignent au maximum 10^6 ufc/cm². Un milieu minimum apparaît plus propice que des aliments à la formation de biofilms et à la formation de polymères exocellulaires.
- La faible capacité colonisatrice de *E. coli* O157:H7 peut s'expliquer par l'absence d'expression de fimbriae observée chez la grande majorité des souches de *E. coli* O157:H7 étudiées.
- L'adhésion sur les végétaux se fait préférentiellement sur les racines des plantes et sur les zones abîmées et coupées.
- Les *E. coli* O157:H7 ne montrent pas de résistance particulière aux désinfectants et apparaissent avoir une sensibilité proche, voire plus forte, que d'autres *E. coli* et que d'autres bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*.

QUESTION N°29 : QUE SAIT-ON DU COMPORTEMENT DES STEC VIS-A-VIS DES PRINCIPAUX FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES ?

Avertissement :

Les données de valeurs cardinales présentées dans cette section, relatives à la température, au pH et à l' a_w , sont des données générales, avec mention de valeurs moyennes. La Section H, de ce document, aborde plus précisément la variabilité inter-souches.

Par ailleurs, il est à noter que la grande majorité des travaux effectués à ce jour sur le comportement des STEC concerne essentiellement le sérotype O157:H7.

Pour l'ensemble des questions de cette Section G, les termes de Réductions Décimales, appliqués pour exprimer la quantification des effets d'assainissements obtenus par différents procédés, sont abrégés en « RD ».

1 Température

1.1 Effet de la température sur la croissance

En milieu synthétique de laboratoire, la majeure partie des souches de STEC étudiées montre une température optimale (T_{opt}) de croissance de 40°C (Gonthier *et al.*, 2001; Nauta and Dufrenne, 1999), une température minimale de croissance (T_{min}) de 6-7°C et une température maximale de croissance (T_{max}) estimée à 45,5°C (Gonthier *et al.*, 2001; Nauta and Dufrenne, 1999).

Ainsi, le comportement de croissance des STEC vis à vis de la température est analogue à celui de *E. coli* en général. Ces données montrent que la température d'enrichissement de 42°C, telle que préconisée par les méthodes normalisées pour le recouvrement de *E. coli* O157:H7 (voir Section F-Question n°26), validées par l'AFNOR, se situe au-delà de la température optimale de croissance des STEC en général.

En milieu alimentaire, une croissance a été observée dans des jus de pommes non fermentés à 8°C et dans des salades à 12°C (Abdul-Raouf *et al.*, 1993a).

Une étude de fond a été entreprise dans le cadre du projet SYM-Previsus visant à estimer les paramètres cardinaux et les aptitudes de croissance de plusieurs souches de *E. coli* dans différentes matrices. Il est prévu que ces données soient disponibles dans les toutes prochaines années.

1.2 Résistance aux traitements thermiques

E. coli O157:H7 n'est pas considéré à l'origine comme une bactérie thermorésistante (Doyle and Schoeni, 1984). Les traitements thermiques considérés comme efficaces vis à vis de *Salmonella sp.* le sont également vis à vis de *E. coli* O157:H7 (ICMSF, 1996).

Deux paramètres sont essentiellement utilisés pour caractériser la thermorésistance bactérienne :

- $D_{T^{\circ}C}$, désigne le temps de réduction décimale (RD) et correspond à la durée d'application nécessaire d'une température donnée ($T^{\circ}C$) pour détruire 90 % du nombre de germes initialement présents,
- z est la différence en degrés Celsius séparant deux températures pour lesquelles les valeurs de D sont dans un rapport de 1 à 10.

Les paramètres de thermorésistance de *E. coli* O157:H7 et de quelques autres sérotypes de STEC ont été déterminés dans différentes matrices (viandes, lait et jus de pommes). Les principaux résultats obtenus sont restitués dans le Tableau 12 et montrent une variabilité de thermorésistance suivant les matrices. Par exemple, la thermorésistance de *E. coli* O157:H7 apparaît plus élevée dans de la viande hachée de bœuf que dans celle de poulet (Juneja *et al.*, 1997).

A côté de ces valeurs classiques, des travaux ont mis en relief l'existence de phénomènes de résistance accrue aux traitements thermiques suite à l'application de chocs physiologiques. En effet, comme pour d'autres bactéries pathogènes, le phénomène d'augmentation de la thermorésistance suite à un choc thermique (exposition à une température sublétales) a été rapporté pour différentes souches de *E. coli* O157:H7 (Juneja *et al.*, 1998; Murano and Pierson, 1992).

En particulier, Juneja *et al.* (1998) ont montré qu'un choc thermique (exposition de 15 à 30 minutes à 46°C) entraîne une augmentation du temps d'application d'une température de 60°C de 1,5 fois dans du bœuf haché et de 1,6 fois dans du bœuf entier pour obtenir 4 RD d'une population de *E. coli* O157:H7. Cette thermorésistance accrue de *E. coli* O157:H7 dans le bœuf haché disparaît après un stockage réfrigéré de 14 heures à 4°C.

Au cours des mêmes travaux, il a été observé qu'un choc thermique de 25 minutes à 46°C provoque une augmentation des niveaux de production de deux protéines de poids moléculaires de 60 et de 69 kDa, immunologiquement reliées respectivement aux protéines GroEL et DnaK. Ces deux protéines sont des protéines dites « de choc thermique » (HSPs pour Heat Shock Proteins) et font plus largement partie de la famille des protéines de stress, permettant aux bactéries de restaurer des fonctions cellulaires après une exposition à des chocs environnementaux. L'expression des protéines de choc chez *E. coli* est notamment régulée par le facteur σ^{38} codé par le gène *rpoS* (Cheville *et al.*, 1996). L'augmentation du niveau de la protéine de 60 kDa après un choc thermique est particulièrement important (Juneja *et al.*, 1998). Cette protéine a un rôle connu de protection des ARN polymérase (ARNP) contre l'inactivation thermique et permettrait la restauration des fonctions des ARNP dénaturées par la chaleur (Georgopoulos *et al.*, 1994).

L'effet des traitements thermiques interagit également avec l'effet d'autres facteurs liés à la matrice dont le pH, la teneur en sel et la présence d'additifs.

Dans du jus de pommes ou du jus d'orange, la thermorésistance à 52°C ($D_{52^\circ\text{C}}$) de cellules de *E. coli* O157:H7, préalablement adaptées à un environnement acide (cellules cultivées 18 h à 37°C, en milieu TSB supplémenté avec 1% de glucose, selon le protocole défini par Buchanan et Edelson (1996)), est considérablement plus élevée que celle de cellules témoins ou que celle de cellules simplement exposées à un choc acide (cellules cultivées 16h à 37°C en milieu TSB puis incubées 2 h à 37°C dans le même milieu dont le pH a été ajusté à 4,8, en moins d'une minute, par ajout d'acide lactique) (Ruy and Beuchat, 1998).

La présence simultanée de 8 % de NaCl, de 4 % de lactate de sodium et de 0,5 % de polyphosphates dans de la viande de dinde entraîne des valeurs de thermorésistance à 50, 55, 57 et 60°C de *E. coli* O157:H7 significativement supérieures à celles obtenues dans de la viande sans ces additifs, indiquant que ceux-ci favorisent la survie de la bactérie (Krotola and Conner, 1997).

Enfin, des travaux récents de Byrne *et al.* (2002) ont clairement mis en relief l'influence du procédé et de la formulation sur la thermorésistance de *E. coli* O157:H7 dans des steaks hachés de bœuf. Au cours de ces travaux, les souches de *E. coli* O157:H7 ont été inoculées dans des parures de bœuf frais, servant à la fabrication de 4 sortes de steaks hachés : de « haute qualité » (100 % bœuf) et de « basse qualité » (economy burgers), contenant 70 % de viande de bœuf et 30 % d'autres ingrédients (dont des assaisonnements, du soja, du sel, de l'eau et de l'oignon), les steaks étant préparés soit à partir de parures fraîches, soit à partir de parures ayant subi les traitements suivants : une congélation (-18°C pendant 37h), un stockage en mode congelé (-18°C pendant un mois) et une décongélation par un traitement aux micro-ondes (passage de -18 à -3°C en 6 minutes).

Il apparaît que la thermorésistance de souches présentes dans des steaks hachés de basse qualité est significativement plus élevée que celles de souches présentes dans des steaks contenant 100 % de viande de bœuf. Ce constat est observé pour des steaks fabriqués à partir soit de parures fraîches ou de parures ayant subi des traitements de congélation-décongélation. Par ailleurs, les valeurs de thermorésistance sont moins élevées pour les steaks fabriqués à partir de parures congelées-décongelées que de parures fraîches (Tableau 12).

Il apparaît essentiel dans l'établissement de barèmes thermiques sécuritaires vis à vis de *E. coli* O157:H7 (détermination et validation) de tenir compte à la fois des caractéristiques de la matrice ainsi que de l'historique (état physiologique) des souches contaminant l'aliment avant l'application du traitement (chocs froids, chocs acides, ...).

Des recommandations pratiques ont été émises concernant l'application de traitements thermiques aux aliments aux Etats-Unis et au Royaume Uni :

- La Food Safety Inspection Services (FSIS, Etats-Unis, Septembre 2001) recommande pour l'inactivation des *E. coli* O157:H7 dans les hamburgers, boulettes de viande, viandes en sauce et pains de viande d'atteindre des températures, à cœur des produits, de 160°F (71,1°C) pour la cuisson et de 165°F (73,9°C) pour le réchauffage de ces mêmes produits cuits ;
- Au Royaume Uni (ACMSF, 1995) et en Irlande (FSAI, 1999), les recommandations de cuisson pour les steaks et steaks hachés de bœuf sont de maintenir une température à cœur de 70°C pendant 2 minutes.

Par ailleurs, des industriels américains (Wisconsin) ont validé un barème de pasteurisation du jus de pommes de 14 secondes à 68,1 °C qui permet de détruire un mélange de souches de *E. coli* O157:H7 préalablement adaptées dans un environnement acide (Mak *et al.*, 2001).

Tableau 12 : Thermorésistance des STEC estimée dans diverses matrices alimentaires

Souches	Matrices	D (minutes)	z (°C)	Références
<i>E. coli</i> O 157:H7	Bœuf haché	D _{57°C} = 6,4	5,3	(ICMSF, 1996)
Mélange de 4 souches de <i>E. coli</i> O157:H7	Bœuf haché	D _{55°C} = 21,13 D _{60°C} = 3,17 D _{65°C} = 0,39	6	(Juneja <i>et al.</i> , 1997)
Mélange de 4 souches de <i>E. coli</i> O157:H7	Poulet haché	D _{55°C} = 11,83 D _{60°C} = 1,63 D _{65°C} = 0,36	6	(Juneja <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> O157:H7	Jus de pommes	D _{55°C} = 5 D _{58°C} = 1	ND*	(Splittstoesser <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. coli</i> O111	Lait (écrémé ou entier)	D _{55°C} = 6,6	5,3	(ICMSF, 1996)
<i>E. coli</i> O157:H7	Steak haché 100%bœuf (frais)	D _{55°C} = 20,8 D _{60°C} = 2,7	ND*	(Byrne <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> O157:H7	Steak haché 100% bœuf (congelé)	D _{55°C} = 9,3 D _{60°C} = 1,9	ND*	(Byrne <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> O157:H7	Steak haché de « basse qualité » (frais)	D _{55°C} = 41,1 D _{60°C} = 4,2	ND*	(Byrne <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> O157:H7	Steak haché de « basse qualité » (congelé)	D _{55°C} = 11,7 D _{60°C} = 2,4	ND*	(Byrne <i>et al.</i> , 2002)

*ND : non déterminé

1.3 Effet de la congélation et de la décongélation

L'effet de la succession de la congélation et de la décongélation sur le comportement de *E. coli* O157:H7 a été étudié dans diverses matrices alimentaires.

1.3.1 Viandes, lait et œufs

E. coli O157:H7 (n°932, CDC, Atlanta) peut survivre au moins 9 mois, sans perte notable de viabilité dans des palets de 45 g de viande de bœuf hachée, placés 30 minutes à -80°C, puis conservés à -20°C (Doyle and Schoeni, 1984).

Les travaux de Sage et Ingham (1998) ont montré que l'effet d'une congélation (24 heures à -20°C), suivie d'une décongélation selon 3 modalités (12 heures à 4°C , 3 heures à 23°C ou par traitement au micro-ondes de 120 secondes à 700 W) sur de la viande de bœuf hachée se traduit par une faible réduction des populations de 4 souches de *E. coli* O157:H7, comprise entre 0,62 et 2,52 RD au mieux.

Bollman *et al.* (2001) ont étudié la survie, à la congélation, d'un ensemble de souches de *E. coli* O157:H7 dans diverses matrices alimentaires (lait, œufs entiers, viandes hachées de porc et de bœuf, saucisses) et dans un bouillon témoin (TSB), à partir de suspensions bactériennes ayant préalablement subi un choc froid (1 h 30 à 10°C). Dans les viandes de bœuf et de porc, aucun effet cryoprotecteur n'est conféré par l'application du choc froid. Au contraire, le choc froid induit une meilleure survie dans les autres matrices (lait, œufs et saucisses) ainsi que dans le milieu TSB à pH 7, avec des populations de cellules revivifiables pouvant être jusqu'à 1000 fois plus élevées dans le cas de cellules préalablement exposées à 10°C . Cette protection vis à vis de la congélation conférée par le choc froid, s'accompagne de la synthèse *de novo* d'une protéine de pHi 4,8. Toutefois, il apparaît que l'effet protecteur du choc froid est d'autant plus grand que les souches se sont initialement multipliées à une température élevée (37°C vs. 20°C). En effet, pour des souches ayant poussé à 20°C , l'application d'un choc de 1 heure 30 à 10°C n'induit pas de cryorésistance accrue. De plus, une acidification du milieu (TSB à pH 5) conduit également à annuler l'effet cryoprotecteur conféré par le choc froid.

1.3.2 Fruits et jus de fruits

Knudsen *et al.* (2001) ont montré qu'un mélange de souches de *E. coli* O157:H7 montrait une faible inactivation après un mois de conservation dans des fraises congelées à -20°C , en présence ou non de 20 % de saccharose, les réductions observées étant de 0,7 à 2,2 RD respectivement.

Dans du jus de pommes non pasteurisé, neutralisé à pH 7 (NaOH) et conservé 16 jours à -20°C , aucune inactivation n'est observée pour des cellules de différentes souches de *E. coli* O157:H7 (Yamamoto and Harris, 2001). De 1 à 3 RD peuvent être observées après deux semaines de conservation à -20°C lorsque le pH des jus est inférieur ou égal à 4,2.

Ainsi, quelle que soit la matrice alimentaire, un simple traitement de congélation/décongélation n'induit que de faibles réductions des populations et ne peut ainsi être considéré comme une stratégie de maîtrise des STEC dans les aliments qui ne sont pas soumis à d'autres traitements assainissants.

2 pH

2.1 pH et croissance : pH_{opt}, pH_{max} et pH_{min}

En milieu synthétique de laboratoire, *E. coli* O157:H7 montre, en moyenne, des valeurs de pH_{opt} d'approximativement 6,9 et de pH_{max} de 9,4 (Nauta and Dufrenne, 1999) (voir Section H). Les valeurs moyennes de pH_{min} 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*.

2.2 Différence d'action entre les acides minéraux et les acides organiques

Les valeurs de pH_{min} 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.

2.3 Résistance des STEC aux pH très acides

Une particularité de *E. coli* O157:H7 est de pouvoir être isolé et d'être capable de survivre dans une grande diversité de denrées à pH acide, d'origine animale ou végétale, telle que les produits carnés fermentés (Abdul-Raouf *et al.*, 1993b; Glass *et al.*, 1992; Riordan *et al.*, 1998), les produits laitiers fermentés (Dineen *et al.*, 1998; Massa *et al.*, 1997), le jus de pommes (Zhao *et al.*, 1993), la mayonnaise (Benjamin and Datta, 1995; Zhao and Doyle, 1994), les sauces pour salades (Skandamis and Nychas, 2000), et même le vinaigre (Tsujihata *et al.*, 1998).

2.3.1 Mécanismes d'adaptation à l'acidité

La résistance à l'acidité (acid resistance ou acid habituation en anglais) fait en général référence à l'exposition prolongée d'un micro-organisme à des conditions modérément acides (pH 5) amenant celui-ci à survivre en environnement très acide, de pH inférieur ou égal à 2,5 (Foster, 1995). L'acidotolérance (acid tolerance en anglais) fait, elle, référence à la survie accrue d'un micro-organisme exposé à des pH allant de 2,5 à 4, après une brève exposition de celui-ci à des pH modérément acides. Cette résistance à l'acidité implique non seulement la survie prolongée du micro-organisme dans les aliments à pH acide mais joue également un rôle lors du passage de la bactérie dans l'estomac (voir Section C-Question n°6).

Les phénomènes de résistance à l'acidité existent chez de nombreuses Entérobactéries dont *E. coli* et *Salmonella sp.*. Chez les STEC, plusieurs mécanismes ont été décrits.

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 inductible, 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 3,85 ainsi que dans des aliments à pH acide (salami et jus de pommes de pH 5 et 3,4 respectivement). 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 (Benjamin and Datta, 1995; Brudzinski and Harrison, 1998; Buchanan and Edelson, 1999; Leyer *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2001; Uljas and Ingham, 1998). 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 σ^{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. Bien plus, l'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).

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).

2.3.2 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-tolérantes, d'après leur survie observée, *in vitro*, à pH 2,5. Aucun lien direct n'a été observé entre l'acido-tolérance 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 ajustés par HCl.

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.* (2001a) 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 bœuf 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.

2.3.3 Effet de la matrice (formulation) et de l'environnement de stockage sur la résistance à l'acidité

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.

➤ 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'acido-tolérance est d'autant plus grande que l'osmolarité du milieu est forte (Cheville *et al.*, 1996). 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.

➤ Etudes dans les aliments

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 (Conner and Kotrola, 1995; Rocelle *et al.*, 1996; Skandamis and Nychas, 2000; Uljas and Ingham, 1998; Uyttendaele *et al.*, 2001b; 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. Certaines souches, préalablement adaptées à un environnement acide, peuvent survivre au moins 30 jours à 4°C dans de la pulpe de raisin.

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 : de 0,1 à 0,5 RD suivant la température (Wu *et al.*, 2002). La réduction la plus importante est toutefois observée lors d'une conservation des salades à 21°C (0,4 à 0,5 RD), alors qu'une réduction plus faible (0,1 à 0,2 RD) est observée lorsque les salades sont conservées à 4 ou à 11°C.

Inversement, à 7°C ou à -18°C, la survie de *E. coli* O157:H7 est d'autant plus favorisée que le pH est bas : la survie à pH 4,5 est plus importante qu'à pH 5,4 et qu'à pH 7,0 (Uyttendaele *et al.*, 2001b).

Dans la pratique, le pilotage du pH des denrées alimentaires ne peut constituer le seul élément de maîtrise des contaminations par les STEC, et ceci d'autant plus que les denrées sont conservées à des températures de réfrigération.

3 a_w

Les études ont essentiellement porté sur des milieux et produits dont l' a_w était contrôlée par l'ajout de NaCl.

L'activité de l'eau minimale pour la croissance (a_{wmin}) de *E. coli* O157:H7 est de 0,96 selon les données de l'ICMSF (1996). D'après des travaux plus récents, *E. coli* O157:H7 présente une a_{wmin} moyenne de 0,953 (Nauta and Dufrenne, 1999). L' a_w optimum pour la croissance est de 0,995 selon les données de l'ICMSF (1996).

L'effet du NaCl a été essentiellement étudié en association avec d'autres facteurs.

En milieu synthétique (TSB), *E. coli* O157:H7 se développe bien à 2,5 g/L de NaCl ($a_w = 0,97$) et peut croître à 6,5 g/L, avec toutefois un allongement important de la phase de latence. A partir de 8,5 g/L de NaCl, l'inhibition devient totale (Glass *et al.*, 1992). Dans un autre milieu synthétique de laboratoire (BHI), *E. coli* O157:H7 peut se développer à 3,5 g/L de NaCl (Tomicka *et al.*, 1997).

L' a_{wmin} de *E. coli* O157:H7, ajustée par du NaCl, dépend de la température : pour une durée d'expérience de 24 jours, à 37°C, aucune croissance de *E. coli* O157:H7 (mélange de 3 souches) n'est observable par mesure de turbidité pour des concentrations en NaCl de 8 à 10 g/L en milieu TSB et à 10°C, aucune croissance n'est observable sur la durée de l'expérience à 4 à 6 g/L de NaCl (Conner, 1992).

L'effet de la teneur en NaCl est également lié au pH du milieu. Les travaux de Guraya *et al.* (1998) ont montré que, dans du lait écrémé (10 % de lait écrémé en poudre réhydraté), *E. coli* O157:H7 subit une réduction de 3 RD à 4 g/L de NaCl à pH 4,7 pour différents temps et températures d'incubation. A 6 g/L, l'inhibition est totale quels que soient les traitements. Et les auteurs de conclure que l'augmentation de la teneur en sel accroît l'inactivation du pathogène lorsque le pH est situé entre 4,1 et 4,7 (Guraya *et al.*, 1998). Au contraire, Juneja *et al.* (1999) ont montré un effet protecteur du sel sur *E. coli* O157:H7 intervenant en milieu à pH 4. Ce dernier constat est en accord avec les travaux récents de Casey et Condon (2002) (voir 2.3-Résistance des STEC aux pH très acides).

L'effet de la teneur en sel dans les produits alimentaires est également lié à la présence d'une flore annexe et à la présence d'autres ingrédients et additifs. A titre d'exemple, Tomicka *et al.* (Tomicka *et al.*, 1997) ont étudié la survie de *E. coli* O157:H7 en milieux modèles représentant une matrice saucisse en cours de fermentation. Dans le modèle de fabrication dit « américain » (fermentation courte, conduite à température élevée), en présence de 2 % de NaCl, d'une flore annexe, de dextrose et de nitrite de sodium, *E. coli* O157:H7 peut survivre plus de 51 jours. Et les auteurs de conclure qu'au cours de ce procédé, le sel et le nitrite de sodium favorisent la survie du pathogène. Dans un modèle de fermentation « européen » (fermentation plus longue à température modérée), une inhibition est constatée après 9 jours lorsque les inocula sont faibles. Pour de forts inocula, la survie est maintenue plus de 30 jours. Selon les auteurs, la survie du pathogène est attribuée, dans ce cas, à l'inhibition par le NaCl et le nitrite de sodium ajoutés de la flore de compétition qui ne peut plus donc agir sur l'inactivation de *E. coli* O157:H7.

QUESTION N°30 : QUE SAIT-ON DU COMPORTEMENT DES STEC LORS DU CONDITIONNEMENT DES DENREES ALIMENTAIRES ET LORS DE L'UTILISATION DE CONSERVATEURS ET D'ADDITIFS ?

1 Influence du mode de conditionnement des produits (sous air, sous vide et sous atmosphère modifiée) sur le comportement des STEC

L'aérobiose facilite en général le développement de *E. coli* O157:H7 par opposition à l'anaérobiose (Vernozy-Rozand and Montet, 2001). Toutefois, les différences observées dans les deux conditions sont minimales et la bactérie s'adapte bien dans les deux cas (Buchanan and Klawitter, 1992). En effet, les études menées sur l'effet du conditionnement de différents types d'aliments montrent que celui-ci possède une influence négligeable sur le comportement de *E. coli* O157:H7.

Abdul-Raouf *et al.* (1993a) ont montré que le mode de conditionnement affecte très peu la croissance et la survie de *E. coli* O157:H7 contaminant des légumes. Uyttendaele *et al.* (2001a) ont étudié le comportement de *E. coli* O157:H7 inoculés à la surface de steaks de bœuf, conservés suivant 3 modalités : sous vide, sous atmosphère modifiée (40 % CO₂, 60 % N₂) ou sous air. Aucun conditionnement testé n'influence la survie de *E. coli* O157:H7. Toujours dans le même sens, aucun effet significatif du mode de conditionnement (sous air, sous vide ou sous CO₂) n'a été constaté au cours du stockage à 21, 4 ou -20°C de tranches de pepperoni contaminées lors de leur fabrication par un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7 (Faith *et al.*, 1997).

2 Influence des produits utilisés comme conservateurs et autres additifs alimentaires à effet antimicrobien sur le comportement des STEC

2.1 Nitrites

Le nitrite, sous forme de nitrite de sodium (E250), est traditionnellement utilisé lors de la fabrication de produits carnés transformés en salaison, crus (produits fermentés type saucisson sec) ou cuits (jambon cuit), pour son rôle fondamental sur les qualités organoleptiques des produits (couleur et goût) mais aussi pour sa capacité à inhiber *Clostridium botulinum* (Christiansen *et al.*, 1975).

Cette activité antimicrobienne n'est pas cantonnée à *Clostridium botulinum* car, à pH acide, le nitrite se convertit en monoxyde d'azote (NO), composé capable d'inhiber plusieurs micro-organismes.

Les nitrites sont des additifs réglementés, utilisables uniquement dans les produits de salaison de viandes crues ou cuites, dans les conserves de viandes et le foie gras. En France, le nitrite de sodium, peut être incorporé à des doses de 150 mg/kg, avec des quantités résiduelles de 50 mg/kg (NaNO₂) dans les produits de charcuterie et de salaison, non cuits, séchés et de 100 mg/kg dans les autres produits de charcuterie. Les nitrites ne sont utilisables que sous forme de sel (NaCl) nitrité à 0,6 %.

L'activité antimicrobienne du nitrite de sodium est fortement dépendante du pH. L'effet d'inhibition sur *E. coli* O157:H7 est observé pour des pH < 5,5 et cet effet est d'autant plus élevé que la température de conservation est basse (Buchanan and Bagi, 1994).

Casey et Condon (2000) ont montré l'importance de l'effet du nitrite dans l'inactivation de *E. coli* O157:H45 dans des saucisses fermentées. Ces auteurs ont noté un effet bactériostatique à des pH > 5 et un effet bactéricide pour des taux de nitrite de 100 mg/kg et plus, lorsque les produits se situent dans des zones de pH < 5. A des taux de 200 mg/kg de nitrite, la population de cellules de *E. coli* O157:H45 décroît 100 fois plus vite qu'en l'absence de nitrite. Et les auteurs de conclure que la diminution du taux de nitrite, à traitement technologique identiques aux pratiques courantes, dans des saucisses fermentées peut sérieusement compromettre la sécurité de ces produits.

Riordan *et al.* (2000) ont étudié le comportement de *E. coli* O157:H7 lors de la fabrication de pepperoni, suivant différentes formulations : sel (2,5 à 4 %), nitrite de sodium (100 à 400 mg/kg) et ajustement du pH (4,4 à 5,6) par addition de dextrose. Avec le procédé de fabrication mis en œuvre, aucune formulation n'a permis d'atteindre les 5 RD de *E. coli* O157:H7 recommandées par la Food Safety Inspection Service (FSIS, Etats-Unis). La formulation commerciale standard, c'est à dire 2,5 %

de sel, 100 mg/kg de nitrite et une quantité de dextrose amenant le pH à 4,8, permet d'obtenir 0,41 RD pendant la fermentation et 0,43 RD pendant le séchage de 7 jours. Pour une meilleure inactivation, les auteurs proposent de tester une addition d'acide lactique combinée à un chauffage doux.

2.2 Acides organiques

Les acides lactique, acétique, citrique, malique, tartrique... et leurs sels sont des additifs dits « généralement autorisés ». Ils sont autorisés sur la base du *quantum satis*, c'est à dire de la dose nécessaire en fonction des habitudes de la profession et de l'appréciation des industriels. La toxicité de ces molécules est pour sa plus grande partie liée à la fonction acide de la molécule.

Les additifs tels que les acides sorbique, benzoïque, *p*-hydroxybenzoïque, propionique, fumarique... et leurs sels sont des additifs agissant à faible dose, allant de 0,05 à 0,2 % et, comme les nitrites, sont dits « autorisés sous certaines conditions » (Directive CE 95/2 du 20 janvier 1995 transcrite dans le droit français par l'arrêté du 2 octobre 1997). Ces acides ont une ou plusieurs activités sur les voies métaboliques spécifiques, ce qui leur confère une toxicité supérieure à celle des précédents.

2.2.1 Acides sorbique, benzoïque et fumarique

L'acide sorbique (E200) et ses sels (sorbate de potassium E202 et sorbate de calcium E203), très solubles dans l'eau, sont utilisés comme conservateurs dans un grand nombre de denrées destinées à l'alimentation humaine et animale ainsi que dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques (Sofos, 1989).

L'ajout de sorbate de potassium à 0,3 % a montré un effet significatif sur l'arrêt de la croissance de *E. coli* O157:H7 dans un fromage frais espagnol (« Queso Fresco ») (Kasrazadeh and Genigeorgis, 1995). L'effet d'inactivation de l'acide sorbique dépend des caractéristiques de la matrice, dont le pH. Ainsi, l'ajout de 0,1 % d'acide sorbique favorise la destruction de *E. coli* O157:H7 à pH 3,4 mais pas à pH 6,4 (Liu *et al.*, 1997). En milieu synthétique de laboratoire (TSB), la croissance de *E. coli* O157:H7 est inhibée par l'ajout de 0,05 % d'acide sorbique ou d'acide benzoïque (E 210) (Koodie and Dhople, 2001). Les mêmes auteurs ont montré que la croissance de *E. coli* O157:H7 dans du jus de pommes est inhibée par l'ajout de 0,1 % d'acide sorbique ou d'acide benzoïque. Par ailleurs, l'ajout d'acide sorbique permet d'augmenter l'efficacité d'autres traitements. Ainsi, Uljas et Ingham (1999) ont obtenu 5 à 10 RD de *E. coli* O157:H7 dans du jus de pommes, avec ajout d'acide sorbique, après un traitement de congélation-décongélation. La $D_{50^{\circ}\text{C}}$ de *E. coli* O157:H7 dans le jus de pomme chute de 18 à 5,2 minutes, en présence d'acide sorbique à 0,1 % (Splittstoesser *et al.*, 1996). Dans le même sens, Dock *et al.* (2000) ont montré que l'ajout de 0,2 % de sorbate de potassium, 0,2 % de benzoate de sodium (E 211) et de 1 % d'acide malique (E 296) à du jus de pommes fait chuter la $D_{50^{\circ}\text{C}}$ de *E. coli* O157:H7 de 65 minutes (jus témoin) à 18 secondes (jus avec les 3 composés). En présence de ces composés pris séparément, les valeurs de $D_{50^{\circ}\text{C}}$ étaient de 13,9 minutes (jus avec 0,5 % d'acide malique), 13,2 minutes (jus avec 0,1 % de sorbate de potassium) et de 7,0 minutes (jus avec 0,1 % de benzoate de sodium).

Lors d'essais conduits *in vitro*, pour 3 souches de EHEC O157:H7, en milieu de Mueller Hinton ajusté à pH 6,5, les concentrations minimales inhibitrices de l'acide sorbique, de l'acide benzoïque et l'acide *p*-hydroxybenzoïque sont respectivement de 4, 4 et 16 mg/mL (Yamamura *et al.*, 2000). L'ajout de doses de 0,2 % d'acide sorbique (doses maximales autorisées au Japon) à de la viande hachée conservée 7 jours à 37°C, montre un effet uniquement bactériostatique pour la viande de bœuf et aucun effet inhibiteur pour la viande de poulet.

Comes et Beelman (2002) ont montré un effet bactéricide de l'acide fumarique (E 297), ajouté à raison de 0,1 % dans du jus de pommes ajusté à pH 3,3. Dans les mêmes conditions, l'acide malique et l'acide citrique ne montrent aucun effet bactéricide. Ces auteurs ont montré une corrélation entre l'augmentation de la présence de la forme non dissociée de l'acide fumarique et l'effet bactéricide observé, indiquant que le facteur bactéricide est fortement lié à la forme non dissociée de l'acide.

Comes et Beelman (2002) montrent qu'un ajout conjoint d'acide fumarique (0,15 %) et de benzoate de sodium (0,05 %), permet d'obtenir plus de 5 RD pour 3 marques commerciales différentes de jus de pommes, étuvés 6 heures à 25°C et conservés pendant 24 heures à 4°C. Ces jus de pommes avec additifs présentent des qualités organoleptiques jugées acceptables par les consommateurs.

Masuda *et al.* (1998) ont montré que les différents composants d'une sauce soja (assaisonnement fermenté obtenu à partir de fèves de soja), *i.e.* 10 à 16 % de NaCl, 5 % d'éthanol, acide lactique ou acétique à pH 4,5, 0,06 % de benzoate de sodium, 0,005 % d'acide *p*-hydroxybenzoïque, ont un effet bactéricide maximal vis à vis de *E. coli* O157:H7 si et seulement si, ces composants se retrouvent en mélange dans le milieu. L'effet isolé de chacun de ces composants, certes bactériostatiques, est bien moindre que celui produit par le mélange.

2.2.2 Acides organiques produits par la flore annexe

Les acides organiques présents dans les denrées alimentaires peuvent être ajoutés (additifs) ou bien produits directement dans la matrice alimentaire au cours du procédé de fabrication. C'est particulièrement le cas de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (flore « starter »). L'effet bactéricide potentiel de bactéries lactiques, telles que les Lactobacilles, sur des souches de STEC, dépend de la capacité de ces souches à produire de l'acide lactique. A titre d'exemple, Ogawa *et al.* (2001) ont montré que l'effet cytotoxique de l'acide lactique non dissocié sur 3 souches de STEC de sérotype O157:H7, se divise en 2 phases : une phase bactériostatique (de 3,2 à 62 mM) puis bactéricide, pour des concentrations en acide lactique supérieures à 62 mM.

Berdholt *et al.* (1999) ont isolé de jambon cuit sous-vide et de cervelas (« servelat » - saucisse norvégienne cuite et non fermentée), cinq souches de *Lactobacillus sakei* capables d'inhiber la croissance de *E. coli* O157:H7 au cours d'un stockage de 4 semaines à 8°C et 10°C. Dans ces conditions, aucune altération des propriétés organoleptiques des produits n'est percevable pendant 21 jours.

2.3 Bactériocines

Autres substances produites par les bactéries, qui peuvent être soit ajoutées sous une forme purifiée soit directement produite par une flore utile dans l'aliment, les bactériocines possèdent un potentiel antimicrobien (bactériostatique et/ou bactéricide) en vue de la maîtrise des STEC dans les aliments. (voir Section G-Question n°32).

2.4 Phosphates et Polyphosphates

La fonction première des polyphosphates est technologique. Les polyphosphates sont des agents complexant les cations di et trivalents, en particulier, le calcium, le magnésium, le fer et le nickel. De ce fait, les polyphosphates ont des actions sur le pouvoir de rétention d'eau, cette efficacité étant renforcée au cours des cuissons, sur la solubilité des protéines en général et de la myosine en particulier, sur la rancidité, en complexant les cations (Fe^{2+} et Ni^{+}) catalyseurs d'oxydation.

Outre leur rôle principal d'additifs alimentaires fonctionnels, les polyphosphates possèdent un effet antimicrobien potentiel.

Des résultats contradictoires concernant l'efficacité d'inactivation sur *E. coli* O157:H7 ont été obtenus suivant les formes de phosphates employés, les types de viandes (bœuf / porc) et la présence d'épices et autres ingrédients / additifs. Dans les matrices alimentaires, les polyphosphates semblent plus efficaces dans les produits hachés (Prakash, 2000). Cependant, une marque commerciale de poly, méta et ortho-phosphates de sodium a montré une efficacité très réduite sur l'inhibition de la croissance et la survie de *E. coli* O157:H7 dans de la viande de bœuf pourtant hachée. Cette efficacité était un peu améliorée dans des saucisses fraîches de porc (Flores *et al.*, 1996). Les auteurs ont attribué ces résultats à l'absence de traitement thermique des produits, et donc au fait qu'il n'y ait pas eu inactivation des phosphatases de la viande. Dans la viande de porc, une synergie d'action entre les polyphosphates et les épices ajoutées à la préparation de viande peut être évoquée.

2.5 Substances antimicrobiennes produites par les plantes

Friedman *et al.* (2002) ont étudié l'activité bactéricide de 96 huiles essentielles et de 23 de leurs composés sur plusieurs bactéries pathogènes dont *E. coli* O157:H7. Les huiles essentielles possédant la plus forte activité bactéricide sur *E. coli* O157:H7 sont celles provenant d'origan, de thym, de cannelle, de *palmarosa*, de feuilles de laurier, de clou de girofle, de citronnelle. Les composés ayant la plus forte activité bactéricide sur *E. coli* O157:H7 sont les suivants : carvacol, cinnamaldéhyde, thymol, eugénol, salicylaldéhyde, géraniol, isoeugénol, citral, périllaldéhyde et estragole.

En particulier, les activités antimicrobiennes attribuées à l'origan (feuilles et fleurs) et au thym (feuilles) leur sont conférées par leurs huiles essentielles, qui contiennent deux terpènes : le carvacrol et le thymol (Davidson and Naidu, 2000). La concentration minimale létale (MLC - réduction supérieure à 2 RD) sur *E. coli* O157:H7 est de 450 à 900 µg/mL d'huile de thym, soit 225 µg/mL de carvacrol ou de mélange thymol-carvacrol (Cosentino *et al.*, 1999).

Autre ingrédient végétal d'intérêt, l'ail possède une activité antimicrobienne connue depuis longtemps attribuée à un thiosulfinate appelé allicine (Cavallito *et al.*, 1944). L'ail possède une activité bactéricide contre *E. coli* O157:H7 (Sasaki *et al.*, 1999). Ces auteurs ont observé l'abaissement de 6 RD de *E. coli* O157:H7 en 6 et en 24 heures respectivement, en présence de 1 % de solutions d'ail préparées à partir de bulbes fraîchement récoltés ou bien récoltés une année auparavant. Le composé actif, l'allicine, est soluble dans l'eau et thermostable (persistance d'activité antimicrobienne après un traitement de 20 minutes à 100°C) (Sasaki *et al.*, 1999). Par ailleurs, il est largement reconnu que ce sont les extraits d'ail frais qui possèdent la plus forte activité antimicrobienne (Sasaki *et al.*, 1999; Whitmore and Naidu, 2000).

Généralement, l'effet bactériostatique ou bactéricide vis à vis des STEC, d'un certain nombre de substances extraites de plantes, dont l'ail et l'origan, ou d'épices, est avéré. Cependant, pour que ceux-ci puissent être employés à des fins antimicrobiennes, leur qualité sensorielle doit être acceptable aux doses utiles et le procédé demeurer économiquement viable.

2.6 Molécules utilisées pour la décontamination de surface des viandes et des végétaux

2.6.1 Utilisation des acides organiques

➤ Décontamination des carcasses

Les acides lactique ou acétique sont largement utilisés dans certains pays (Etats-Unis) en traitement de décontamination de surface des carcasses de bœuf, porc, agneau ou de volailles. Le mode d'application des sprays de solution d'acide (dose, moment...) doit être judicieusement réfléchi afin d'induire une réduction significative des contaminations et de ne pas détériorer le produit d'un point de vue organoleptique (Smulders and Greer, 1998).

De nombreux travaux ont été conduits pour évaluer l'efficacité de l'acide lactique ou acétique pour la décontamination des carcasses en STEC, en particulier pour *E. coli* O157:H7.

Castillo *et al.* (2001) ont étudié des traitements de décontamination de carcasses de bœuf par application de sprays d'acide lactique ; l'application de sprays avant (15 secondes à 55°C, 250 mL à 2 % d'acide lactique) et après ressuyage (30 secondes à 55°C, 500 mL d'acide lactique à 4 %) conduit à diminuer les contaminations en *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée obtenue à partir des carcasses traitées. Calicioglu *et al.* (2002) constatent une amélioration de l'efficacité des traitements de décontamination des carcasses à l'acide lactique (2 %) en pré-traitant celles-ci avec une solution de de tergent non-ionique, le Tween 20 à 5 %.

Comme mentionnée par Samelis *et al.* (2002), l'application de tels traitements peut provoquer l'adaptation de cellules de *E. coli* O157:H7, résultant de chocs acides sublétaux. De plus, ces traitements acides, par aspersion ou lavage, entraînent un avantage écologique pour certains groupes microbiens, dont les bactéries lactiques et les levures, susceptible de bouleverser l'équilibre écologique des ateliers de production et de transformation de viande. Enfin, l'efficacité des « sprays » d'acides organiques pour la décontamination des carcasses dépend de l'historique des souches et notamment de leur adaptation ou non à un environnement acide préalablement à la contamination des carcasses. Ainsi, les études concernant l'efficacité des traitements de décontamination des carcasses par des acides organiques, devraient impérativement prendre en compte la variabilité de sensibilité des souches ainsi que l'état physiologique probable des souches contaminant les carcasses (adaptées aux acides ou non) (Berry and Cutter, 2000).

Il existe des recommandations d'utilisation de sprays d'acide lactique, acétique ou citrique, pour la décontamination des viandes rouges produites aux Etats-Unis (<http://www.fsis.usda.gov>). Ces recommandations précisent notamment les doses à employer : de 1,5 à 2,5 %. De telles pratiques de décontamination ne sont pas autorisées aujourd'hui dans l'union Européenne.

➤ Décontamination des végétaux

Les traitements avec des solutions d'acides organiques sont également employées en vue de la décontamination de produits végétaux frais. Un traitement de surface avec des solutions de vinaigre (1 à 2 % d'acide acétique), contenant 3 à 7 % de sel, permettent d'abaisser de 3 RD les *E. coli* O157:H7 présents en surface de choux et de concombres (Entani *et al.*, 1997).

La fumigation de graines de haricots avec des solutions à 242 µL d'acide acétique par litre d'air pendant 12 heures à 45°C permet d'obtenir un abaissement de 6 RD de *E. coli* O157:H7, sans préjudice pour la germination ultérieure des graines (Delaquis *et al.*, 1999).

2.6.2 Utilisation de composés chlorés

➤ Décontamination par immersion ou aspersion par des solutions chlorées

L'eau chlorée est largement utilisée, en aspersion ou immersion, pour la décontamination des fruits et légumes entiers ou fraîchement émincés. Les doses employées sont généralement de 50 à 200 ppm de chlore (Eckert and Ogawa, 1998; Han *et al.*, 2001). Toutefois, les traitements à l'eau chlorée produisent généralement un effet assainissant inférieur à 3 RD sur les fruits et légumes (Beuchat, 1999; Brackett, 1992).

Récemment, les travaux de Fett (2002) ont montré l'obtention de 4 à 5 RD de populations mixtes de *Salmonella sp.* et de *E. coli* O157:H7 inoculées en surface de graines de haricots pour des temps de contact de 15 minutes avec une solution à 3 % (w/v) de Ca(OCl)₂ (hypochlorite de calcium) tamponnée à pH 6,8. Ce traitement n'affecte pas la germination ultérieure des graines mais ne permet toutefois pas d'éliminer la totalité des cellules de *Salmonella sp.* et de *E. coli* O157:H7 présentes.

Pour la viande, Castillo *et al.* (1999) ont obtenu sur des carcasses de bœuf contaminées par *E. coli* O157:H7 ou par *Salmonella* Typhimurium des réductions similaires pour les 2 bactéries, avec obtention de 3,8 et 3,9 RD respectivement par un lavage à l'eau suivi de l'application de sprays de chlorite de sodium activé à l'acide phosphorique. L'efficacité du traitement est améliorée (obtention de 4,5 et 4,6 RD respectivement) lorsque le chlorite de sodium est activé par l'acide citrique.

➤ Décontamination par le dioxyde de chlore (ClO₂) sous forme gazeuse

Le gaz ClO₂ est un agent oxydant très puissant, à large spectre antimicrobien. Son pouvoir oxydant est de 2 à 3 fois celui du chlore. Son utilisation est flexible : il ne s'ionise pas dans l'eau, son efficacité bactéricide ne varie pas avec le pH et il ne produit pas de co-produits dangereux. Le ClO₂ est très largement utilisé comme traitement assainissant de l'eau, à laquelle il ne confère pas le goût de chlore. L'efficacité du ClO₂ est considérée comme 7 fois supérieure à un traitement équivalent en chlore pour inactiver les populations bactériennes présentes dans les eaux utilisées en abattoirs de volailles (Lilliard, 1979).

Han *et al.* (2001) ont proposé un modèle de l'efficacité de traitements au ClO₂ de poivrons verts inoculés en surface par *E. coli* O157:H7, en fonction de différents paramètres (concentration : 0,1 à 0,5 mg/L, humidité relative : 55 % à 95 %, temps : 7 à 135 minutes et température de traitement : 5 à 25°C). Ainsi, les paramètres déterminants du traitement sont la dose de ClO₂ ainsi que le temps de contact. Ces paramètres agissent en synergie avec l'humidité relative. Le modèle a été validé par 8 essais et permet de déterminer les traitements efficaces permettant d'atteindre 5 RD.

L'utilisation de solutions acidifiées (acide phosphorique ou acide citrique) d'hypochlorite de sodium (NaOCl) est également approuvée par la FDA (1998a) pour la décontamination des carcasses de viande rouge et des carcasses de volailles. Elle l'est également (doses de 40 à 50 ppm) pour le traitement des produits de la mer (FDA, 1999) pour leur lavage, décongélation et stockage.

Par ailleurs, l'utilisation du ClO₂ est également approuvée par la FDA (Food and Drug Administration, Etats-Unis) pour le traitement de fruits et de légumes découpés frais (FDA, 1998b) et de l'eau utilisée dans les abattoirs de volailles (FDA, 1995b).

QUESTION N°31 : QUE SAIT-ON DE LA RESISTANCE DES STEC AUX PROCÉDES PHYSIQUES ET AUX NOUVELLES TECHNOLOGIE DE DECONTAMINATION DES ALIMENTS ?

1 Ionisation

Le traitement ionisant consiste à soumettre les aliments, soit à un rayonnement gamma (issu du cobalt 60), soit à des rayons X d'énergie supérieure à 5 MeV, soit à un faisceau d'électrons accélérés de moins de 10 MeV. Les effets positifs (amélioration de la durée de conservation...) comme négatifs (mauvaises odeurs...) dépendent de la « dose » appliquée, mesurée en gray (Gy), 1 gray correspond à l'absorption d'une énergie d'un Joule par kg d'aliment. Ainsi, des doses de 1 à 6 kGy permettent la destruction de la plupart des bactéries pathogènes non-sporulées (traitement équivalent à une pasteurisation). Rappelons que dans les conditions appliquées au traitement des aliments (doses inférieures à 100kGy), il n'existe aucun risque d'apparition de radioactivité dans les denrées et les produits ionisés ne présentent aucune potentialité toxique pour les consommateurs, ce qui a été reconnu dès 1980 par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.).

Des études spécifiques ont porté sur l'efficacité des traitements ionisants pour l'inactivation des *E. coli* O157:H7 dans les aliments. En particulier, l'ionisation est un outil très efficace dans la réduction des *E. coli* pathogènes sur les surfaces de fruits frais et de légumes : des doses de 0,2 à 0,8 kGy, selon les conditions de l'environnement, permettent l'obtention d'une RD (Beuchat *et al.*, 1998).

L'effet des rayonnements ionisants sur la viabilité de *E. coli* O157:H7 dépend de la dose appliquée mais aussi de la température d'application, de l'atmosphère et du stade de croissance des cellules. Plus la température est basse, plus *E. coli* O157:H7 est résistant à l'ionisation (Buchanan *et al.*, 1999; Lopez-Gonzales *et al.*, 1999). Des doses de 0,27 kGy à 5°C et de 0,42 kGy à -5°C permettent d'obtenir une RD de cellules de *E. coli* O157:H7 ensemencées en surface de viande de poulet désossée mécaniquement (Thayer and Boyd, 1993). Dans de la viande de bœuf hachée, des cellules de 5 souches de *E. coli* O157:H7 inoculées à raison de 10⁸ ufc/g sont moins résistantes lorsque le traitement est appliqué à 4°C qu'à -20°C, les D₁₀ étant respectivement de 0,39 ± 0,04 et de 0,98 ± 0,23 kGy (Byun *et al.*, 1998).

L'état physiologique des cellules est également à prendre en compte dans l'efficacité du traitement. Les cellules de *E. coli* O157:H7 sont plus sensibles aux rayonnements ionisants lorsqu'elles se trouvent en phase exponentielle de croissance plutôt qu'en phase stationnaire (Byun *et al.*, 1998; Vernozy-Rozand and Montet, 2001). Enfin, Buchanan *et al.* (1999) ont montré que l'induction d'une acido-résistance chez des cellules de *E. coli* O157:H7 (croissance des cellules en milieu TSB + 1 % de dextrose amenant à pH final de 4,7) provoque une augmentation de la résistance aux rayonnements ionisants.

L'application de rayonnements ionisants est approuvée aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) depuis 1997 pour le traitement de viandes brutes et élaborées de bœuf et de poulet, réfrigérées ou congelées, avec un objectif affiché de réduire, voire détruire, les populations de *E. coli* O157:H7 et d'autres micro-organismes pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*...). Cette décision, longtemps bloquée par les associations de consommateurs, suit de près le retrait du marché de 11 000 tonnes de steaks hachés congelés soupçonnés d'être contaminés par *E. coli* O157:H7.

Le traitement ionisant est impérativement accompagné d'un étiquetage spécifique en vue d'informer les consommateurs (Directive 7700.1, 2/22/2000 : Irradiation of meat and poultry products, disponible sur le site <http://www.fsis.usda.gov/>). Une enquête menée fin 2001 a montré que les consommateurs américains sont de plus en plus favorables à cette technologie (Salvage B., Anthrax attack have bolstered perception of food irradiation, « www.meatingplace.com »). Toujours aux Etats-Unis, la construction d'un irradiateur à rayons X a démarré en 2001 pour la désinfection des fruits et légumes importés sur le continent américain.

La directive européenne (Directive 1999/2/CE, JOCE 13/3/99) avec son amendement (Liste des autorisations des Etats Membres relatives aux denrées et ingrédients alimentaires pouvant être soumis à un traitement par ionisation, JOCE., 28/4/01) a été retranscrite en France dans l'arrêté du 20 août 2002 (J.O.R.F. n°208 du 06 septembre 2002, page 14821). Comme aux Etats-Unis, l'application du procédé doit être accompagnée d'un étiquetage systématique des denrées, dans un but de transparence vis à vis des consommateurs. Et contrairement aux Etats-Unis, les steaks hachés sont exclus de la liste positive des denrées pouvant être soumise à un traitement ionisant. En effet, rappelons que le procédé d'ionisation ne peut en aucun cas se substituer au respect des bonnes pratiques d'hygiène.

A l'heure actuelle, l'application de ce procédé en France est peu répandu (environ 7 000 tonnes de denrées traitées en 2001, (DGCCRF, 2002)).

2 Rayons X pulsés ou Pulsed X-Ray

Curry *et al.* (1999) ont observé 2 RD de cellules de *E. coli* O157:H7 inoculées dans du bœuf haché en appliquant des impulsions de rayons X de 10^7 - 10^8 rads/seconde. Pour des doses de 0,2 à 0,9 kGy, le traitement aux rayons X pulsés est apparu plus efficace qu'un traitement analogue aux rayons gamma (inactivation supérieure de 6 %).

3 Rayonnements UV

Les traitements aux rayonnements ultraviolets (UV) sont largement utilisés pour la désinfection des eaux de consommation et des eaux utilisées en production agro-alimentaire ainsi que des surfaces de contact en industrie agro-alimentaire. Des travaux récents ont étudié le comportement de *E. coli* O157:H7 face au traitement aux rayonnements UV.

Sommer *et al.* (2000) ont montré des différences de sensibilité aux traitements UV dans l'eau parmi un ensemble de 7 STEC O157:H7 et d'une souche témoin de *E. coli* (ATCC 11229). En particulier, certaines souches de STEC possèdent une capacité à réparer les acides nucléiques endommagés par le traitement. Ainsi, pour obtenir 6 RD pour l'ensemble des souches testées, des doses d'UV à 253,7 nm de 300 J/m² sont nécessaires. Les recommandations autrichiennes de doses de 400 J/m² d'UV pour la désinfection de l'eau apparaissent ainsi sécuritaires.

Des essais sur d'autres matrices alimentaires ont été conduits pour évaluer l'efficacité de ces traitements sur l'inactivation de *E. coli* O157:H7.

Wright *et al.* (2000) ont étudié l'effet d'un traitement aux UV sur une population de souches de *E. coli* O157:H7 acido-résistantes, inoculées à raison de 6,3 RD ufc/mL de jus de pommes non pasteurisé. Le traitement a consisté à appliquer au jus de pommes contaminé, une exposition superficielle aux UV à 254 nm d'intensité comprise entre 94 J/m² et 610 J/m². En moyenne, 3,8 RD ont été obtenues, avec des variations en fonction de la flore microbienne annexe présente dans les jus.

Kim *et al.* (2002) ont obtenu 8,64 RD de *E. coli* O157:H7 en suspension dans l'eau par un traitement aux UV à 254 nm durant 3 minutes avec une intensité de 5 J/m². Ce même traitement permet d'obtenir seulement 0,36 à 1,28 RD pour des contaminations de surface de viande de poulet, avec ou sans peau.

Ce procédé de décontamination, peu coûteux par rapport aux autres procédés d'assainissement non thermiques, est appliqué au jus de pommes et a récemment reçu un agrément par la Food and Drug Administration (FDA, Etats-Unis) pour le traitement des jus de fruits clairs (pommes).

4 Hautes pressions

Le traitement des aliments aux hautes pressions est un procédé de compression et de décompression adiabatiques, c'est à dire sans transfert de chaleur, dans une gamme de 100 à 800 Mega Pascal (MPa), pour des temps de 0,001 à 1200 secondes ou plus.

Les formes bactériennes sporulées et les formes végétatives des bactéries à Gram positif en général, sont considérées comme plus résistantes aux traitements aux hautes pressions que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, Patterson *et al.* (1995) ont mis en évidence une résistance chez une souche clinique de *E. coli* O157:H7, analogue à celle rencontrée pour des spores bactériennes. En effet, pour une durée de traitement de 15 minutes, 700 MPa sont nécessaires pour obtenir 5 RD de *E. coli* O157:H7 dans du tampon phosphate, alors que 375 MPa doivent être utilisés pour obtenir le même effet sur *Listeria monocytogenes*. Dans du lait UHT ou dans du poulet, Patterson et Kilpatrick (1998) ont montré la nécessité de combiner un traitement thermique et l'application de hautes pressions (400 MPa, à 50°C pendant 15 minutes) pour obtenir 5 à 6 RD de *E. coli* O157:H7 NCTC 12079.

Alpas *et al.* (1994) ont mis en évidence une diversité de sensibilité parmi différentes souches de *E. coli* O157:H7. Toutefois, l'efficacité d'un traitement aux hautes pressions, comme mentionné ci-dessus, est toujours nettement accrue lorsque la température d'application est portée à 50°C.

Il est fortement recommandé que les travaux de mise au point du procédé d'inactivation par cette technologie soient réalisés à partir de souches considérées comme résistantes au sein d'une espèce. Dans ce but, Farkas et Hoover (2000) ont proposé les souches de *E. coli* O157:H7 C490 (Benito *et al.*, 1999) et 30-2C4 (souche pathogène isolée de salami), encore plus résistantes aux hautes pressions que la souche NCTC 12079.

Le traitement UHP (Ultra High Pressure) est actuellement utilisé dans différents pays : aux Etats-Unis (confitures, jus de fruits, guacamole, sauces salsas...), en Europe (jambon, jus de fruits...), au Japon (yaourts aux fruits, riz prêt à consommer...).

5 Ozone

Bien qu'utilisée depuis longtemps pour le traitement de l'eau, l'ozonation est relativement nouvellement envisagée comme traitement assainissant des aliments. Aux Etats-Unis, l'ozone, reconnue comme GRAS (Generally Recognised As Safe) pour le traitement de l'eau en bouteilles (FDA, 1995a), bénéficie également de ce statut lorsqu'elle est utilisée comme traitement assainissant des aliments (EPRI, 1997). Son odeur le rend détectable à partir de 0,01-0,05 ppm, c'est à dire à des niveaux bien inférieurs à ceux dangereux pour la santé humaine (Source : OSHA : Occupational Safety and Health Administration).

L'activité antimicrobienne de l'ozone réside dans son fort pouvoir oxydant, à l'origine de la lyse cellulaire. En raison de son instabilité, l'ozone doit être produite localement. Son utilisation est délicate car son pouvoir oxydant élevé conduit à la détérioration des surfaces à son contact.

Toutefois, l'utilisation de l'ozone comme agent assainissant de diverses denrées alimentaires en est encore au stade expérimental. Les travaux concernant son efficacité sur les STEC sont peu nombreux à ce jour.

Dans des conditions de laboratoire, un traitement à l'ozone à des concentrations de 3 à 18 ppm pendant 20 à 50 minutes sont nécessaires pour éliminer *E. coli* O157:H7, la résistance des souches testées étant plus élevée en milieu gélosé (TSA) qu'en tampon phosphate (Byun *et al.*, 1998).

Sharma *et al.* (2002) ont testé l'efficacité d'un traitement à l'ozone sur des graines de luzerne inoculées avec un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7. Une arrivée directe d'ozone (« *sparging* ») sur les graines immergées dans de l'eau associée à un traitement de celles-ci pendant 3 heures à 60°C, permet d'obtenir 4 à 4,8 RD. Toutefois, l'élimination n'est pas complète puisque des cellules de *E. coli* demeurent revivifiables après ce traitement.

Aujourd'hui, le développement du procédé d'ozonation pour l'assainissement de denrées alimentaires à grande échelle nécessite, en tout premier lieu, de pouvoir estimer quantitativement les changements physiques et biochimiques subis par les denrées (aspects sensoriels, nutritionnels..).

QUESTION N°32 : QUE SAIT-ON DES INTERACTIONS ENTRE LES STEC ET LES AUTRES MICRO-ORGANISMES DANS LES ALIMENTS ?

En milieux synthétiques de laboratoire ou dans les aliments, la présence d'une flore microbienne annexe peut avoir un effet significatif sur le comportement des STEC et se traduire par des effets positifs (compétition dans les matrices alimentaires...) ou négatifs, par exemple, lors de la recherche des STEC dans les aliments (compétition sur les milieux de culture...).

A côté des mécanismes de compétition, Cornu *et al.* (1999) ont mis en évidence, en milieu minimal synthétique de laboratoire, un commensalisme entre plusieurs souches de *E. coli* O157:H7 et *E. coli* K12. En effet, lorsque les deux micro-organismes sont en présence, la croissance de *E. coli* O157:H7 est favorisée par rapport à celle observée en présence de la souche en culture pure en milieu minimal alors que celle de *E. coli* K12 reste inchangée. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette interaction serait due à une libération de méthionine dans le milieu par *E. coli* K12. En effet, une supplémentation en méthionine du milieu minimal de croissance produit le même effet sur la croissance de *E. coli* O157:H7 que la présence de *E. coli* K12

Autre exemple d'interaction, Duffy *et al.* (1999) ont observé le comportement d'une souche de *E. coli* O157:H7 (380-94, épidémie liée à du salami), en milieu synthétique (BHI), en présence de différentes flores annexes : *Pseudomonas fragi*, *Brochothrix thermosphacta*, *Hafnia alvei* et *Pediococcus sp.*, choisies pour leur fréquence d'isolement sur milieux carnés bruts ou transformés. A 37°C, *Hafnia alvei* inhibe de façon significative la croissance de *E. coli* O157:H7 (allongement de la phase de latence, diminution du taux de croissance et de la densité maximale atteinte). Ce type d'interaction de compétition entre Entérobactéries peut avoir des implications négatives lors de la recherche du pathogène à partir de bouillons d'enrichissement d'échantillons contenant des nombres élevés d'Entérobactéries. A 15°C, l'unique compétiteur de *E. coli* O157:H7 est *P. fragi*, micro-organisme d'altération des viandes, se développant rapidement aux températures de réfrigération, allongeant la phase de latence du pathogène, sans toutefois altérer son taux de croissance et sa densité maximale. Cette action inhibitrice est toutefois faible et n'existe plus en présence de *Brochothrix thermosphacta*, autre bactérie d'altération des viandes. Ce qui signifie que *E. coli* O157:H7 peut parfaitement croître dans des viandes lors d'un dérapage de la maîtrise des températures de réfrigération (8-10°C) et ceci, avant que n'apparaissent les signes visibles de l'altération. Toujours dans le cadre de cette étude, *Pediococcus acidilactici* provoque à 37°C uniquement, un allongement de la phase de latence de *E. coli* O157:H7, sans modifier les autres paramètres de croissance.

L'action antagoniste de la flore annexe peut être liée à plusieurs mécanismes parmi lesquels l'épuisement du milieu en nutriments essentiels, la diminution du pH liée à la production d'acides gras volatils à chaîne courte (acide acétique, lactique ou propionique) ou encore la production de bactériocines, composés peptidiques ayant une activité inhibitrice spécifique.

L'effet des acides organiques produits par la flore annexe sur le comportement des STEC a été évoqué dans la Question n°29).

Parmi les bactériocines ayant une efficacité inhibitrice sur les STEC, deux grands types ont été étudiés à ce jour : celles produites par des Entérobactéries et celles produites par les bactéries lactiques. Ces bactériocines peuvent être mises à profit dans l'établissement de flores de barrière ou bien directement dans les aliments, soit sous forme purifiée soit par intégration au produit alimentaire du système comprenant le micro-organisme producteur et son substrat.

1 Bactériocines produites par les *Enterobacteriaceae*

Les colicines et les microcines sont des bactériocines produites par la famille des *Enterobacteriaceae*, capables d'inhiber *E. coli* et d'autres souches étroitement liées. Ces deux familles de bactériocines ont fait l'objet d'études pour évaluer leur activité antimicrobienne sur un ensemble de souches de STEC, du sérotype O157:H7 et d'autres sérogroupes dont O15, O26, O111.

- Les colicines ont un mode d'action bactéricide et leur biosynthèse est létale pour les cellules productrices. Les cellules sensibles aux colicines possèdent des récepteurs situés sur leur membrane externe et sont tuées lors de l'attachement des colicines à ces récepteurs. L'action des colicines sur les STEC a été étudiée depuis le début des années 1990 (Jordi *et al.*, 2001; Murinda *et al.*, 1996; Whittam *et al.*, 1993). En particulier, Jordi *et al.* (2001) ont testé l'action

de colicines produites par un ensemble de souches de *E. coli* sur un ensemble de souches de STEC de différents sérotypes dans des conditions similaires à celle du rumen.

- Les microcines sont des peptides de faible poids moléculaire (< 10 kDa), n'entraînant pas la mort cellulaire lors de leur biosynthèse, résistantes à certaines protéases et relativement thermostables. Ainsi, la microcine J25 (Blond *et al.*, 2001) est capable d'inactiver une population de 10^4 ufc/mL de *E. coli* O157:H7 à des doses de 6,25 µg/mL dans du lait et dans de l'extrait de viande, après une incubation de 24 h à 37°C (Sable *et al.*, 2000).

2 Bactériocines produites par les bactéries lactiques

2.1 Nisine

La nisine fut la première bactériocine utilisée en industrie agro-alimentaire (Mattick and Hirsch, 1947). Produite par *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, elle est la seule bactériocine à être mondialement reconnue comme molécule antimicrobienne, particulièrement contre les cellules végétatives de bactéries à Gram positif et contre les spores de *Bacillus sp.* et de *Clostridium sp.*. La nisine (additif E 234 autorisé sous certaines conditions) est commercialisée sous une forme purifiée (exemple : la Nisaplin, extrait commercial à 0,25 à 18,7 µg de nisine/g). A titre d'exemple, la nisine est utilisée à des doses de 2,5 à 5 mg/kg (soit 100 à 200 mg/kg de Nisaplin) dans du « Cottage cheese » pour inhiber *Listeria monocytogenes* et dans des conserves pour inhiber les *Bacillus sp.* et *Clostridium sp.* (Thomas *et al.*, 2000). Les bactéries à Gram négatif sont en général peu sensibles à l'action de la nisine (Cutter and Siragusa, 1995). Certains auteurs ont toutefois étudié l'effet de la nisine sur la viabilité de *E. coli* O157:H7, toujours en association avec d'autres traitements assainissants. En effet, il a par exemple été observé, *in vitro*, un effet inhibiteur effectif de la nisine sur des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*) endommagées par des chocs acides (Kalchayanand *et al.*, 1992). En milieux synthétiques, 100 UI/mL de nisine sont nécessaires pour inhiber des cellules de *E. coli* O157:H7 traitées 15 minutes à 52,5 °C et pour inactiver totalement celles-ci après un traitement de 10 minutes à 55°C (Lee *et al.*, 2002a). A côté de cela, Mustapha *et al.* (2002) ont montré que la nisine (200 UI/mL) ne possède aucune action synergique avec des solutions d'acide lactique ou polylactique à 2 % en traitement de décontamination de surface de viande de bœuf conservée 28 jours à 4°C, sous vide.

2.2 Reutérine

La reutérine, β-hydroxypropionaldéhyde, produit intermédiaire du métabolisme anaérobie du glycérol par *Lactobacillus reuteri*, est considérée comme un analogue du D-ribose, à large spectre antimicrobien, capable d'inhiber la synthèse d'ADN aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Son effet antimicrobien est reconnu dans les aliments carnés et laitiers. Sa concentration minimale inhibitrice est de 4 AU(Active Unit)/mL pour différentes souches de *E. coli* (El-Ziney, 1997).

Dans du « Cottage cheese », 150 AU de reutérine/g sont suffisants pour éliminer *E. coli* O157:H7 après 7 jours de stockage à des températures de réfrigération (El-Ziney and Debevere, 1998).

La reutérine (500 AU/mL) peut être appliquée en traitement de décontamination de surface de la viande de porc cuite. L'effet d'inactivation immédiat constaté est encore amélioré par un stockage de 24 heures à 7°C (El-Ziney *et al.*, 1999). Dans des barquettes de jambon haché sous vide, l'addition de 100 AU/g de reutérine provoque 5 RD des cellules de *E. coli* O157:H7 après 1 jour de stockage à 7°C (El-Ziney *et al.*, 1999).

L'activité antimicrobienne de la reutérine pourrait être mise à profit par l'intégration du système *Lactobacillus reuteri* et de son substrat, le glycérol, aux ferments intervenant dans la transformation de poissons, de viandes, de fromages et de légumes fermentés (El-Ziney *et al.*, 2000).

QUESTION N°33 : QUE SAIT-ON DE LA CAPACITE DES STEC A ADHERER ET A FORMER DES BIOFILMS?

Une certaine confusion existe sur la définition du mot biofilm et il convient ici de préciser ce que nous entendons par ce terme. Characklis (1989) considère qu'un biofilm est une communauté microbienne adhérant à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères extracellulaires. Selon cette définition, ni la présence d'une matrice extracellulaire, ni un seuil de densité surfacique à atteindre ne sont obligatoires pour pouvoir qualifier une population adhérente de biofilm. D'autres auteurs considèrent que l'on ne peut pas parler de biofilm en absence d'une matrice extracellulaire, laquelle assure la cohésion des microcolonies (Ghigo, 2001; Vidal *et al.*, 1998). Ces derniers auteurs se basent généralement sur des observations (microscopiques ou non) pour déclarer avoir ou non affaire à un biofilm. Il n'existe cependant pas de critère chiffré qui permette de fixer une limite entre ce qui serait et ce qui ne serait pas du biofilm. De plus et surtout, des changements phénotypiques fondamentaux ont lieu juste après l'adhésion des micro-organismes avant qu'une éventuelle matrice extracellulaire ne soit détectable. Parmi ces changements fondamentaux, citons une augmentation de résistance aux agents antimicrobiens (Frank and Koffi, 1990), sujet qui est traité à la Question n°34. Enfin, il faut rappeler ici qu'une faible contamination de surface peut être à l'origine d'une forte contamination d'un produit alimentaire. Pour toutes ces raisons toute communauté microbienne adhérant à une surface mérite notre attention et est ici considérée comme étant un biofilm.

1 Caractéristiques cellulaires impliquées dans l'adhésion et la formation de biofilm

1.1 Caractéristiques physico-chimiques

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces est dépendante des propriétés physico-chimiques de l'extrême surface des corps en présence ainsi que de celles du liquide environnant. Bien qu'à ce jour les méthodes classiques de caractérisation de l'extrême surface des micro-organismes ne permettent de prédire le taux de cellules adhérentes que de façon imparfaite, les données obtenues par ces méthodes sont des indications à prendre en compte.

Ainsi, *E. coli* O157:H7 apparaît avoir une faible hydrophobicité comme le montrent Sherman *et al.* (1987) sur 5 souches différentes et Ukuku et Fett (2002) sur 2 autres souches du même sérotype. Cette caractéristique pourrait selon Ukuku et Fett (2002) expliquer la faible affinité de *E. coli* O157:H7 pour la surface intacte des végétaux qui est elle-même généralement hydrophobe.

Les 2 équipes ne s'accordent cependant pas sur la charge de surface des *E. coli* O157:H7 (mesurée à l'aide de résines échangeuses d'ions) qui apparaît fortement anionique à Sherman, *et al.* (1987) et faiblement anionique à Ukuku et Fett (2002) (charge négative inférieure à celle de 4 *Listeria monocytogenes* et de 3 *Salmonella sp.*). Enfin, lorsque Lytle *et al.* (1999) comparent la mobilité électrophorétique de 7 *E. coli* O157:H7 et 5 *E. coli* de type sauvage, ils constatent que la charge des premières est clairement moins négative que celle des souches de type sauvage.

1.2 Fimbriae

La présence de fimbriae à la surface des cellules de *E. coli* O157:H7 apparaît relativement rare. Ainsi aucune des 13 souches comparées par Cookson *et al.* (2002) n'exprime de fimbriae dans les conditions utilisées et Sherman *et al.* (1987) n'en observent que sur 1 des 5 souches étudiées. Sur les 49 souches de *E. coli* O157:H7 que compte l'étude d'Uhlich *et al.* (2001), 2 seulement expriment des curli (fimbriae torsadé). Cette expression a lieu lors d'une variation de phase associée à des mutations ponctuelles dans le promoteur du gène *csg*³. D'autres STEC en revanche expriment soit des fimbriae de type 1, soit des fimbriae de type curli, soit les 2 types de fimbriae. La colonisation de polystyrène (estimée par une coloration au cristal violet, après 48 heures d'incubation, en présence de milieu de culture) de 2 souches O157:H7 étudiées par Cookson *et al.* (2002) est faible comparée à celle d'un STEC O128:H2 qui exprime les 2 types de fimbriae. Les mutants de cette souche, qui n'expriment pas soit le fimbriae de type 1, soit le fimbriae de type curli, voient leur colonisation diminuer et ce plus fortement pour le mutant n'exprimant pas de curli. En microscopie électronique à balayage, Cookson

³ Les variants rouges (qui expriment les curli) sont plus virulents que les variants blancs (qui n'expriment pas les curli) bien qu'ils ne soient pas différents en matière de production de Shiga-toxine (Uhlich *et al.* 2002).

et al. (2002) constatent que le mutant qui n'exprime pas de fimbriae de type 1 forme un biofilm épais sur du Thermanox™ (polymère de la famille des polyoléfinés) alors que les biofilms réalisés avec le mutant n'exprimant pas de curli sont quasiment monocouche. Les auteurs en déduisent que les fimbriae de type curli sont nécessaires à l'obtention de la structure tridimensionnelle des biofilms. Les *E. coli* O157:H7 dans leur grande majorité n'en n'exprimant pas (dans les conditions utilisées), ont donc une faible capacité à former des biofilms épais.

2 Etude de la formation de biofilms dans les conditions simulant des situations de terrain

L'adhésion et la formation de biofilm, dans des conditions simulant des situations de terrain, ont essentiellement été étudiées sur le sérotype O157:H7. De fait, des souches de ce sérotype ont été isolées à plusieurs reprises sur des surfaces inertes : dans des ateliers de transformation de produits alimentaires et notamment dans la filière viande (Guyon *et al.*, 2001; Little and de Louvois, 1998) ; sur les surfaces inertes constitutives de réservoirs d'eau ou d'abreuvoirs (Buchko *et al.*, 2000; Crump *et al.*, 2002). Enfin, divers végétaux et notamment des grains germés ont été impliqués dans des infections par *E. coli* O157:H7 (voir Tableau 2 et Tableau 3 en Section C). En effet, pour assurer la germination des graines, celles-ci sont régulièrement aspergées d'eau pendant des durées allant de 4 à 7 jours ; or, la forte humidité et le rejet de nutriments par la graine en germination sont favorables à la formation de biofilm (Fett, 2000). Ces 3 situations (viandes, eau et végétaux) ont donc fait l'objet d'évaluation d'une part des capacités colonisatrices de cette bactérie et d'autre part des traitements visant son élimination (voir Section G-Questions n°29 et n°34).

2.1 Adhésion et formation de biofilm sur acier inoxydable en présence de nutriments d'origine carnée, comparaison avec d'autres milieux de culture

Hood et Zottola (1997) ont montré que *E. coli* O157:H7 avait une meilleure capacité à coloniser une surface en acier inoxydable quand la culture était réalisée avec un jus de viande dilué (obtention de près de 10^6 cellules/cm² en 3 jours à 23°C) que lorsque le milieu de culture était du lait écrémé (moins de 10^3 cellules/cm²). Farrel *et al.* (1998) ont haché de la viande contaminée par *E. coli* O157:H7 à raison de 10^2 ufc/g. La durée moyenne de contact entre la viande et le hachoir était de 5,3 minutes. Ils retrouvent après hachage moins de 5 ufc/cm² (tests positifs après enrichissement) sur des lames en acier inoxydable préalablement collées dans le hachoir. Lorsque la même expérimentation est réalisée avec une viande comptant 10^6 ufc/g (dose très fortement supérieure à celle d'une situation réelle) on retrouve de l'ordre de 10^3 à 10^4 ufc/cm² sur les lames en acier inoxydable. La teneur en graisse de la viande n'a pas d'effet significatif sur le transfert des bactéries vers l'acier inoxydable.

Le milieu TSB (bouillon tryptone soja) qui permet, dans l'étude de Hood et Zottola (1997), l'obtention de densités surfaciques légèrement inférieures à celles obtenues avec le jus de viande dilué, apparaît à Dewanti et Wong (1995) comme un milieu nettement moins favorable qu'un milieu minimum additionné d'1 mg/L d'extrait de levure et de glucose à 0,04 %. En effet, avec ce milieu minimum, la colonisation d'un acier inoxydable est plus rapide : elle atteint 10^6 ufc/cm² en 2 jours à 25°C contre un maximum de 10^4 ufc/cm² en TSB. La production de polymères extracellulaires et les forces d'adhésion sont aussi plus élevées avec le milieu minimal alors que la croissance des cellules planctoniques de la culture apparaît plus lente que dans le TSB. Il a été observé que de nombreuses souches de *E. coli* O157:H7 produisent de l'acide colanique en condition de stress (Junkins and Doyle, 1992; Mao *et al.*, 2001). Or, ce polymère apparaît nécessaire à la cohésion des cellules au sein des microcolonies de *E. coli* K12 (Danese *et al.*, 2000). Il est vraisemblable que le stress que représente la privation nutritionnelle (milieu de culture minimal), favorise la synthèse d'acide colanique et la plus forte formation de biofilm observée par Dewanti et Wong (1995). Malgré cela, lorsque ce milieu minimal est utilisé pour contaminer soit de l'acier inoxydable soit la surface intacte de pommes (Burnett *et al.*, 2000), on constate par microscopie à balayage laser confocal que les cellules de *E. coli* O157:H7 adhèrent de façon isolée voire en petits amas, mais pas sous la forme de grosses microcolonies comme celles formées par des espèces à fort pouvoir colonisateur, par exemple du genre *Pseudomonas* qui peuvent atteindre des densités surfaciques de 10^8 ufc/cm² (Leriche and Carpentier, 1995; Leriche, 1999).

2.2 Adhésion et formation de biofilm dans des conditions stimulant des conduites d'eau, comparaison de divers matériaux

Buswell *et al.* (2001) montrent que parmi le verre et différents matériaux de plomberie tels que le cuivre, l'acier inoxydable et le polybutylène, c'est ce dernier matériau qui permet la plus forte colonisation par un *E. coli* O157 dans un réacteur simulant les conditions régnant dans des conduites de distribution d'eau froide et d'eau chaude. Le verre et le cuivre sont, dans ces conditions, les matériaux les moins propices à l'établissement de biofilm. Ces auteurs ne chiffrent cependant pas les densités surfaciques obtenues. En ce qui concerne le cuivre, il faut rappeler que ce matériau a un effet antimicrobien et qu'il est reconnu comme peu propice à la colonisation microbienne (Chen *et al.*, 1993; Pongratz *et al.*, 1994; Schoenen and Wehse, 1988). Ainsi quand Assanta *et al.* (2002) observent par microscopie que le cuivre est plus fortement contaminé par *E. coli* O157:H7 que du polyéthylène, il est vraisemblable (comme le montrent Chen *et al.* (1993) pour un *Pseudomonas aeruginosa*) qu'une grande partie des cellules observées ne soient plus viables.

2.3 Adhésion et formation de biofilms sur des surfaces végétales (graine et germe de luzerne, laitue, melon, pomme)

2.3.1 Comparaison de *E. coli* O157:H7 avec d'autres bactéries pathogènes

Barak *et al.* (2002) ont mis en contact des graines germées de luzerne avec des suspensions de 5 souches différentes de *E. coli* O157:H7 pendant 4 heures. Après 3 rinçages, il reste de 1 à 2 ufc par germe. Une même expérimentation avec différentes souches de *Salmonella enterica* ou avec d'autres sérotypes de *E. coli*, montre des adhésions nettement supérieures (jusqu'à 10^3 ufc/germe). Lorsque ce sont les graines de luzernes qui sont directement inoculées et mises à germer pendant 3 jours sans rinçage préalable, *E. coli* O157:H7 (1 souche testée) atteint des concentrations microbiennes toujours inférieures (moins de 10^6 ufc/germe) à celles obtenues avec d'autres sérotypes de *E. coli* (plus de 10^6 à 10^9 ufc/germe). Takeuchi *et al.* (2000) montrent, contrairement à ce que Barak *et al.* (2002) ont observé sur des graines germées de luzerne, que *E. coli* O157:H7 adhère en plus grand nombre qu'une salmonelle (ici *Salmonella* Typhimurium) ($P < 0,05$) aux feuilles de laitue. Les différences sont cependant très faibles ; ainsi par exemple, sur la surface des feuilles on a en \log_{10} (ufc/g) 5,0 et 4,8 pour les 2 espèces bactériennes respectivement et 4,7 pour *Listeria monocytogenes*. En revanche, la comparaison de *E. coli* O157:H7 avec d'autres bactéries pathogènes réalisées par Ukuku et Fett (2002) montre des différences beaucoup plus fortes. Ainsi 3 souches de *E. coli* (dont 2 de sérotype O157:H7) adhèrent en plus grand nombre à la surface d'un melon cantaloup (5,2 à 5,8 log ufc/cm²) que 3 souches de salmonelles (4,3 à 4,8 log ufc/cm²) et que 4 souches de *Listeria monocytogenes* (2,9 à 3,2 log ufc/cm²). Ce sont cependant alors les *E. coli* qui montrent les plus faibles forces d'adhésion (évaluées par le pourcentage de cellules qui restent à la surface du melon après un lavage à l'eau).

2.3.2 Zone d'adhésion préférentielle

Ce sont les racines des graines germées de luzerne qui portent le plus grand nombre de cellules (Charkowski *et al.*, 2002). Il en est de même de plants de laitue. Wachtel *et al.* (2002) montrent qu'après une incubation d'une nuit de plants de laitue en présence d'une suspension dans l'eau distillée de *E. coli* O157:H7 (4 souches), un rinçage et un lavage, les cellules adhèrent préférentiellement aux racines de la plante et aux enveloppes de la graine (de l'ordre de 10^3 ufc sur les racines et sur les enveloppes de la graine, la pousse ne compte que de l'ordre de 10^2 ufc). Seo et Frank (1999) ainsi que Takeuchi *et al.* (2000) montrent que *E. coli* O157:H7 adhère préférentiellement aux bords coupés de feuilles de laitue et dans les stomates de ces feuilles contrairement à *Pseudomonas fluorescens* qui adhère préférentiellement aux zones intactes des feuilles. Ce *Pseudomonas* est alors sous forme de microcolonies alors que *E. coli* O157:H7 adhère en cellules isolées. Il est intéressant de noter que la colonisation préalable des feuilles de laitue par *Pseudomonas fluorescens* n'a pas d'effet sur l'adhésion de *E. coli* O157:H7 (Seo and Frank, 1999). Enfin, Burnett *et al.* (2000) montrent que l'adhésion de *E. coli* O157:H7 sur les pommes se fait aussi préférentiellement sur les zones de discontinuité de la cuticule de cire et sur les tissus abîmés. A ces emplacements on visualise par microscopie à balayage laser confocal, des amas cellulaires de grosses tailles. Ainsi, la bactérie pathogène peut pénétrer dans la pomme jusqu'à 70 µm sous la peau et aussi jusqu'aux graines en passant par le tube floral.

QUESTION N°34 : QUE SAIT-ON DE LA RESISTANCE DES STEC A LA DESINFECTATION, EN COMPARAISON AVEC D'AUTRES BACTERIES ?

Il est bien connu à ce jour qu'après adhésion à une surface inerte, une proportion des microorganismes de la population adhérente résiste fortement aux agents antimicrobiens (à notre connaissance aucune bactérie n'échappe à ce phénomène) (Frank and Koffi, 1990). Cette proportion est variable selon le matériau support (Krysinski *et al.*, 1992) et augmente avec l'âge du biofilm (Frank and Koffi, 1990). Il est aussi connu que le classement de désinfectants sur la base de leur efficacité testée sur des cellules en suspension n'est pas le même que lorsque les essais sont réalisés sur des biofilms (Carpentier and Cerf, 1993). Parmi les explications possibles à cette différence de classement, la présence de polymères extracellulaires anioniques (comme l'acide alginique produit par *Pseudomonas aeruginosa* ou l'acide colanique produit par *E. coli* et notamment par le sérotype O157:H7 sous condition de stress) peut neutraliser l'effet des désinfectants cationiques comme les ammoniums quaternaires. On peut en déduire que l'efficacité d'un ammonium quaternaire est différente dans les 3 situations que sont les cellules en suspension, les cellules adhérentes qui n'ont pas produit de matrice extracellulaire ou dont les polymères ne sont pas anioniques, et les cellules adhérentes incluses dans une matrice de polymères anioniques.

Les études recensées montrent que les *E. coli* O157:H7 sont, soit aussi sensibles soit, et c'est le cas le plus fréquent, plus sensibles que d'autres bactéries et notamment d'autres bactéries pathogènes.

1 Essais réalisés sur des cellules en suspension

1.1 Désinfectant de l'eau : le chlore

Rice *et al.* (1999) n'observent pas de différence significative de résistance au chlore de 7 souches *E. coli* O157:H7 et de 4 *E. coli* non pathogènes. Une dose d'1,1 mg/L de chlore libre (1,2 mg/L de chlore total) à 5°C et à pH 7, pendant 1 min, permet de l'ordre de 4 réductions décimales de la population. Les auteurs en concluent que la concentration médiane en chlore résiduel libre de 1,1 mg/L des eaux distribuées aux Etats-Unis et le temps de contact médian de 45 minutes, sont suffisants pour inactiver d'éventuels *E. coli* O157:H7. En France, il a été demandé, dans le cadre du plan Vigipirate renforcé (2001), d'assurer une concentration en chlore libre résiduel de 0,3 mg/L en sortie des réservoirs et de 0,1 mg/L en tout point du réseau de distribution. Il faut rappeler ici que la dose de chlore résiduel est utilisée comme dernière barrière et est précédée par d'autres traitements permettant d'obtenir une qualité microbiologique correcte. Cette dose peut limiter le développement microbien mais n'est pas à proprement parler une dose pouvant assurer la désinfection de l'eau. En France, pour qu'une eau soit considérée de qualité bactériologique satisfaisante, il est demandé une absence de *E. coli* dans 100 mL d'eau et une absence de *E. coli* dans 250 mL pour les eaux vendues en bouteilles ou en conteneur (sauf eau de source préemballée) (décret n° 2001-1220 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles, JORF du 22/12/01). On peut donc conclure que puisque *E. coli* O157:H7 n'apparaît pas plus résistant que les autres *E. coli*, les mesures visant à éliminer ces derniers peuvent être considérées comme efficaces vis à vis du sérotype O157:H7.

1.2 Désinfectants pour l'industrie agro-alimentaire

Taylor *et al.* (1999) montrent que, dans les conditions de la norme BS EN 1276, sur 18 désinfectants du commerce utilisés à 20°C et à la dose préconisée par le fabricant, 15 sont considérés efficaces sur une souche de *E. coli* O157:H7 (5 réductions décimales obtenues en 5 minutes⁴) alors que 13 le sont sur un *Pseudomonas aeruginosa*. A 10°C, ces chiffres tombent respectivement à 14 et à 11 pour les 2 bactéries. Les produits dont l'efficacité est affectée par la température sont certains des ammoniums quaternaires et des amphotères testés.

⁴ Cette performance obtenue sur 4 souches (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Enterococcus hirae* ATCC 10541) permet au désinfectant d'être considéré comme ayant une activité bactéricide selon la définition donnée dans la norme EN 1276.

1.3 Désinfectants et antiseptiques utilisés en milieu hospitalier

Oie *et al.* (1999) observent 4 réductions décimales d'un mélange de 10 souches de *E. coli* O157:H7 (contenant la souche Sakai de l'épidémie japonaise de 1996) par des traitements de 15 secondes à 20°C avec un chlorure de benzalkonium à 0,1 %, du glucuronate de chlorehexidine à 0,1 % additionné d'un surfactant non ionique et de l'éthanol à 80 %. La sensibilité au glucuronate de chlorehexidine du mélange de souches est légèrement plus grande que celle d'un *Enterococcus faecalis* et est similaire à celle d'un *Staphylococcus aureus*.

2 Essais réalisés en suspension et en biofilm sur des surfaces inertes

Venkitanarayanan *et al.* (1999a; 1999b) utilisent une eau salée (12 %) soumise à électrolyse dans les 5 minutes qui précèdent son utilisation (production de chlore à l'anode, le pH est de 2,7 et le potentiel d'oxydo-réduction supérieur à 1100 mV). Ils obtiennent, en 5 minutes et à 4 ou 23°C, de l'ordre de 7 RD de suspensions de *L. monocytogenes*, de *E. coli* O157:H7 et de *Salmonella* Enteritidis (5 souches par espèces bactériennes ont été testées).

Lorsque les mêmes souches de *E. coli* O157:H7 sont préalablement déposées sur du polypropylène (planche de découpe) et mises à sécher pendant 1 heure à température ambiante l'immersion dans l'eau « oxydante électrolysée » permet 6 réductions décimales en 20 minutes à 23°C (durée nettement plus élevée que celle permettant 7 RD sur des cellules en suspension). L'efficacité de cette eau s'améliore lorsque la température est augmentée. Ainsi à 45°C, pendant 10 minutes, une contamination de 10⁸ ufc/100cm² est totalement détruite. Le mélange des 5 souches de *L. monocytogenes* apparaît moins sensible (5 réductions décimales en 20 min à 23°C).

Somers *et al.* (1994) observent qu'un *E. coli* O157:H7 est légèrement plus sensible au phosphate trisodique (TSP) que la bactérie soit en suspension ou en biofilm sur acier inoxydable (10⁵ ufc/cm²) qu'un *Campylobacter jejuni* et est nettement plus sensible que *L. monocytogenes* et *Salmonella* typhimurium. Une dose de 1 % pendant 30 secondes ne permet plus de détecter *E. coli* O157:H7 ni en suspension, ni en biofilm.

Farrell *et al.* (1998) évaluent, sur des lames d'acier inoxydable placées dans un hachoir où de la viande artificiellement contaminée par un *E. coli* O157:H7 a été hachée, l'efficacité de 2 séries d'opérations d'hygiène comportant : (i) un nettoyage par un alcalin (ii) un rinçage (iii) une désinfection soit par de l'acide peracétique à 0,2 % soit par un désinfectant à base de chlore (200 mg/L de chlore libre), (iiii) un stockage pendant 8 heures à 8°C et 70 % d'humidité. Les deux procédures sont équivalentes et laissent moins de 10 ufc/cm² quand la viande a été contaminée à raison de 10⁶ ufc/g. Lorsque la viande compte 10² ufc/g, la procédure comprenant le désinfectant chloré permet une destruction totale de la contamination, alors qu'avec le désinfectant à base d'acide peracétique, 50 % des lames apparaissent contaminées après une phase d'enrichissement.

3 Essais de désinfection des végétaux

De nombreux travaux sur la désinfection concernent celle de végétaux (voir Section G-Question n°31).

4 Etat physiologique après désinfection

Lisle *et al.* (1999) observent qu'un choc au chlore sur des cellules en suspension entraîne une diminution de viabilité de *E. coli* O157:H7 variable selon le mode d'évaluation de l'activité des cellules. Ainsi on peut classer ces modes d'évaluation dans un ordre décroissant de diminution de viabilité : culture, capacité des cellules à s'allonger en présence d'acide nalidixique et d'extrait de levure ou Direct Viable Count (DVC), potentiel de membrane, activité respiratoire, intégrité membranaire. Par ailleurs, Lisle *et al.* (1998) montrent que le pourcentage d'ufc non endommagées (ufc qui cultivent sur milieu sélectif par rapport au nombre d'ufc qui cultivent sur milieu non sélectif) après un choc à l'hypochlorite de sodium (5 mg/L de chlore libre, 5 min. à 20-23°C) passe de 5 à 86 % lorsqu'une suspension de *E. coli* O157:H7 est soumise à privation nutritionnelle pendant 29 jours dans un milieu minimum (M9) sans source de carbone (ces auteurs ne donnent cependant pas le nombre de réductions décimales des ufc obtenues par le choc chlore).

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- Acquisition de données sur les sérotypes non-O157, et en particulier O26, O103 et O111 ; notamment en ce qui concerne la résistance à l'acidité et la recherche de la présence du facteur σ (support génétique de résistance à l'acidité).
- Evaluation de l'effet souche à l'échelon d'un seule sérotype, et en particulier O157:H7.
- Evaluation de la pertinence de mener une étude croissance-survie de STEC dans des aliments typiquement français, qui ne seront pas étudiés à l'étranger (ex : fromage au lait cru).
- Etude de l'impact de la flore antagoniste sur le comportement des STEC dans l'aliment.
- Etude de l'implantation des STEC dans les ateliers IAA (carcasses-surfaces inertes) et dans les installations de distribution et de stockage de l'eau.
- Etude de la coopération entre espèces différentes dans le cadre de la création de biofilms : les STEC sont-elles des bactéries de niches écologiques ?

Section H : Microbiologie Prévisionnelle

Responsable de section : ML. Delignette-Muller

Rédacteurs : ML. Delignette-Muller

Personnalités consultées : M. Cornu – JB. Denis

POINTS A RETENIR

- Divers modèles de croissance permettent de prévoir le taux de croissance de *E. coli* O157 :H7 en fonction de la température, du pH et de la teneur en NaCl de l'aliment. En revanche, aucun modèle ne permet actuellement de prévoir de façon fiable le temps de latence avant croissance dans l'aliment sans expérience préalable.
- Des modèles probabilistes ont été proposés pour décrire la limite croissance-non croissance en fonction des mêmes facteurs.
- Des modèles d'inactivation thermique classiques sont utilisés pour décrire l'effet sur le temps de réduction décimale de la température et parfois d'autres facteurs concomitants (pH, NaCl).
- Des travaux de modélisation de l'inactivation non thermique ont aussi été publiés, mais ceux-ci sont très disparates du point de vue de la méthode utilisée et s'intéressent à des aliments et des facteurs d'inactivation très particuliers.

La microbiologie prévisionnelle est une discipline qui vise à développer des modèles mathématiques permettant de prévoir les aptitudes de croissance, survie ou décroissance des populations microbiennes dans les aliments en fonction des facteurs environnementaux influents. L'utilisation de ces modèles doit être prudente, et précédée par une validation de ceux-ci en prévision, sur des données différentes de celles ayant servi à les construire. Ces modèles peuvent alors être d'une aide précieuse dans diverses applications. Ils peuvent par exemple être utilisés pour estimer la durée de vie d'un produit alimentaire, définir des seuils limites pour des facteurs environnementaux de contrôle, détecter les points critiques dans une démarche HACCP, ou encore évaluer l'exposition à un danger lié à la consommation d'un produit alimentaire.

QUESTION N°35 : QUELS SONT LES DIFFERENTS MODELES UTILISES POUR MODELISER LA CROISSANCE ?

De nombreux modèles ont été développés pour décrire l'effet des facteurs environnementaux les plus influents sur les aptitudes de croissance des populations de micro-organismes colonisant les produits alimentaires. Pour décrire les cinétiques de croissance en tenant compte de facteurs environnementaux, deux niveaux de modèles sont en général utilisés. Un modèle primaire, dit aussi modèle dynamique, est tout d'abord utilisé pour décrire la réponse d'une population de micro-organismes dans un environnement donné, en fonction du temps (cinétique de croissance). Un modèle secondaire, dit aussi modèle des contraintes, est ensuite utilisé pour décrire l'effet des facteurs environnementaux (par exemple la température) sur les paramètres du modèle primaire (par exemple le taux de croissance maximum). Classiquement, ces modèles sont ajustés aux données expérimentales en deux temps :

- premier temps : le modèle primaire est ajusté à des cinétiques de croissance obtenues par dénombrement, dans différentes conditions environnementales, permettant ainsi l'estimation de paramètres de croissance pour chaque cinétique ;
- second temps : le modèle secondaire est ajusté aux données constituées par les paramètres de croissance de chaque cinétique, associés aux facteurs environnementaux correspondants.

Un ajustement global des deux niveaux de modèle peut aussi être effectué, ce qui donne généralement une meilleure estimation des paramètres.

QUESTION N°36 : QUELS SONT LES DIFFERENTS TYPES DE MODELES UTILISES POUR DECRIRE UNE CINETIQUE DE CROISSANCE DANS DES CONDITIONS DONNEES ?

La cinétique de croissance d'une population microbienne, est caractérisée classiquement par quatre paramètres : le niveau initial (x_0 en ufc.mL⁻¹), le temps de latence (lag en h), le taux de croissance maximum (μ_{max} en h⁻¹), et le niveau maximum (x_{max} en ufc.mL⁻¹). Les deux modèles les plus couramment utilisés en microbiologie prévisionnelle pour l'estimation des paramètres de croissance à partir des données observées sont le **modèle de Gompertz modifié** (Gibson *et al.*, 1988; Zwietering *et al.*, 1990) et le **modèle de Baranyi** (Baranyi and Roberts, 1994).

Le modèle de Gompertz modifié est un modèle purement empirique, qui ajuste en général les données de croissance observées de manière satisfaisante. Néanmoins, il présente un certain nombre d'inconvénients mentionnés par divers auteurs (Dalgaard, 1995; Membre *et al.*, 1999; Van Gerwen and Zwietering, 1998; Whiting and Cygnarowicz-Provost, 1992) :

- son utilisation conduit à une surestimation systématique du taux de croissance par rapport à sa définition classique (pente de la phase exponentielle de croissance en coordonnées logarithmiques) ;
- sa valeur au temps $t = 0$ ne correspond pas au niveau initial x_0 ;
- son ajustement ne peut pas être réalisé si la cinétique de croissance n'est pas suivie jusqu'à la phase stationnaire ;
- enfin, ce modèle n'est pas directement utilisable pour simuler des croissances en conditions environnementales variables dans le temps.

Le modèle de Baranyi, qui ajuste aussi très bien les données de croissance généralement observées, est un modèle un peu moins empirique, et qui ne présente pas les inconvénients cités précédemment. Il est basé sur des hypothèses dynamiques qui peuvent certes être discutées, mais vu comme un modèle descriptif, il convient mieux à l'ajustement de cinétiques de croissance microbienne que le modèle de Gompertz modifié (Baranyi and Roberts, 1994; Membre *et al.*, 1999; Van Gerwen and Zwietering, 1998). De plus, sa formulation dynamique permet son utilisation directe pour simuler des croissances en conditions environnementales variables dans le temps, utilisation qui a déjà été validée par plusieurs auteurs en conditions thermiques variables (Alavi *et al.*, 1999; Baranyi *et al.*, 1995; Bovill *et al.*, 2000; Bovill *et al.*, 2001).

A titre d'illustration, la Figure 15 représente l'ajustement des modèles de Gompertz modifié et de Baranyi sur un même cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7 en bouillon, mesurée par dénombrement sur boîte de Petri.

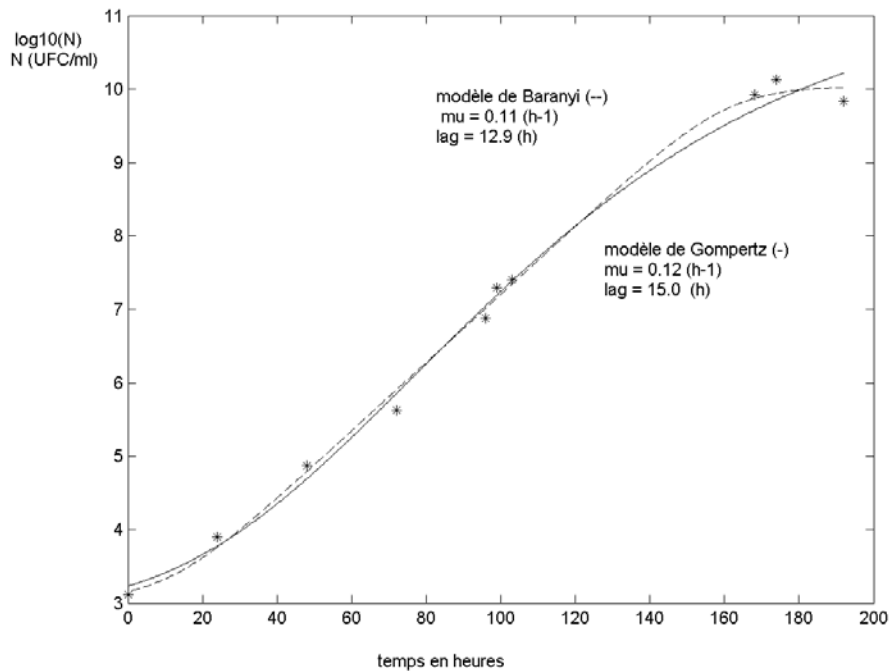


Figure 15 : Ajustement de deux modèles primaires de croissance classiques sur une cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7 en bouillon, mesurée par dénombrement sur boîte de Petri

*Remarque : Tout ce qui est écrit jusque là concerne l'ensemble des micro-organismes étudiés en microbiologie prévisionnelle, et est donc sans doute valable pour les *E. coli* STEC, aucun comportement particulier n'ayant été reporté pour ce groupe de micro-organismes dans cette étape de la modélisation de la croissance.*

QUESTION N°37 : QUELS SONT LES DIFFERENTS MODELES DECRIVANT L'EFFET DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE TAUX DE CROISSANCE ?

Parmi les travaux proposés aujourd'hui, on peut distinguer deux grandes approches méthodologiques différentes de construction de modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le taux de croissance maximum (μ_{\max}) :

- Une **approche multifactorielle** consiste à décrire l'effet simultané de plusieurs facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance à l'aide de modèles polynomiaux encore appelés surfaces de réponse (Buchanan, 1991; Roberts, 1995). Les modèles ainsi obtenus sont en général appelés les **modèles polynomiaux**.
- Une **approche plus progressive** consiste à modéliser indépendamment l'effet de chaque facteur environnemental sur les paramètres de croissance, puis à construire, à partir de ces modèles simples, un modèle général incluant plusieurs facteurs environnementaux, en utilisant une méthode dénommée « **gamma concept** » par Zwietering *et al.* (1992). Cette méthode avait déjà été proposée auparavant (McMeekin *et al.*, 1987) et a été utilisée par ailleurs sans cette appellation (Rosso *et al.*, 1995). Cette méthode repose sur l'hypothèse d'indépendance d'effets entre les différents facteurs environnementaux pris en compte. Les modèles développés selon cette approche sont en général inspirés du modèle « racine carré » proposé par Ratkowsky *et al.* (1983) pour décrire l'effet de la température sur le taux de croissance maximum, et c'est pourquoi ils sont souvent appelés les **modèles de type racine carrée**.

Dans l'approche multifactorielle, chaque modèle est élaboré de façon systématique à partir d'expériences réalisées pour une souche ou un mélange de souches, dans un milieu, en faisant varier les facteurs environnementaux étudiés selon un plan d'expériences bien défini dans une plage de variation donnée. Une surface de réponse caractérisée par de nombreux paramètres est ajustée aux points observés. Cette approche systématique, permet dans tous les cas la construction d'un modèle ajustant correctement les données expérimentales, même lorsque des interactions existent entre les facteurs environnementaux étudiés. Cet avantage cache néanmoins quelques inconvénients. La volonté de construire un modèle ajustant au mieux les données expérimentales conduit naturellement à augmenter le nombre de ses paramètres. Ceci induit un manque de robustesse du modèle dont la forme devient très sensible aux éventuels points expérimentaux atypiques. Les problèmes liés à la surparamétrisation de ces modèles polynomiaux ont été soulevés dans la littérature (Baranyi *et al.*, 1996; Delignette-Muller *et al.*, 1995). D'autre part, le modèle obtenu n'est théoriquement valable que pour le couple souche(s)/milieu étudié et à l'intérieur du domaine expérimental exploré pour les facteurs environnementaux. Toute extrapolation à d'autres milieux ou en dehors de la plage expérimentale est dangereuse. Ceci représente une limitation importante pour une utilisation en prévision.

Dans l'approche progressive, l'effet de chaque facteur environnemental est étudié séparément, pour diverses espèces microbiennes et milieux. A partir des données ainsi observées, un modèle général est élaboré, caractérisé par un petit nombre de paramètres ayant si possible une signification biologique. Un modèle prenant en compte l'effet simultané de tous les facteurs étudiés est ensuite construit en supposant l'absence d'interaction entre ces facteurs. Les modèles ainsi obtenus sont en général simples mais souvent suffisants pour décrire les données observées pour une grande diversité de micro-organismes. Ils ne comportent qu'un petit nombre de paramètres, ce qui les rend robustes. De plus le petit nombre et la signification biologique de leurs paramètres facilitent la démarche de prévision. Celle-ci peut être réalisée à partir d'une information minimale provenant de résultats expérimentaux et/ou de données de la littérature. Néanmoins l'approche progressive présente, elle aussi, quelques inconvénients. En particulier, l'hypothèse d'absence d'interaction entre les facteurs environnementaux représente une limitation au nombre de facteurs que l'on peut prendre en compte dans ces modèles. La prise en compte de telles interactions dans ces modèles n'a que rarement été envisagée et uniquement sur *Listeria* (Augustin and Carlier, 2000; Le Marc *et al.*, 2002).

Les deux approches, multifactorielle et polynomiale, apparaissent donc complémentaires, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Aucune ne peut remplacer l'autre, et il appartient à l'utilisateur de choisir, en fonction du problème posé, la méthode qui satisfera au mieux ses exigences.

1 Modèles de croissance de type polynomiaux

Les modèles polynomiaux qui ont été proposés spécifiquement pour décrire la croissance de *E. coli* O157:H7 sont répertoriés dans le Tableau 13, ainsi que les facteurs environnementaux pris en compte dans chaque modèle, assortis de leur gamme de variation. Ce sont les seuls travaux de ce type portant sur des *E. coli* STEC. Ce sont tous des modèles polynomiaux d'ordre 2 (modèles quadratiques) mis à part le modèle de Buchanan et Bagi (1994) qui est d'ordre 3 (modèle cubique). Ce dernier modèle est utilisé dans le logiciel américain « Pathogen Modeling Program » tandis que le modèle de Sutherland *et al.* (1997) est utilisé dans le logiciel anglais « Food MicroModel ». Les données ayant servi à la construction de ces modèles ont été obtenues en bouillon, le pH ayant été ajusté par ajout d'acide chlorhydrique.

Tableau 13 : Modèles secondaires polynomiaux proposés pour *E. coli* O157:H7

Nombre de paramètres du modèle	FACTEURS ETUDIÉS ET LEURS GAMMES DE VARIATION					Référence
	Température (°C)	pH (HCl)	NaCl %	NaNO ₂ (mg/L)	Atmosphère	
10	10 – 42	4,5 – 8,5	0,5 – 5		aérobie	(Buchanan <i>et al.</i> , 1993)
10	10 - 42	4,5 – 8,5	0,5 – 5		anaérobie	
35	10 – 42	4,5 – 8,5	0,5 – 5	0 – 200	aérobie	(Buchanan and Bagi, 1994)
35	10 - 42	4,5 – 8,5	0,5 – 5	0 - 200	anaérobie	
10	10 - 30	4 - 7	0,5 – 6,5		aérobie	(Sutherland <i>et al.</i> , 1995)
15	10 - 30	4 - 7	0,5 – 6,5		CO ₂ : 0 – 80 %	(Sutherland <i>et al.</i> , 1997)

Un essai de validation du modèle utilisé par le « Pathogen Modeling Program » pour prédire la croissance de *E. coli* O157:H7 dans de la viande de bœuf a été réalisé par Walls et Scott (1996). Des résultats satisfaisants ont été obtenus pour la prédiction du taux de croissance dans les conditions de température et de pH testées.

Les modèles présentés ci-dessus ont tous été construits à partir de données obtenues sur des mélanges de 3 ou 4 souches. On pourrait être tenté de dire qu'ils prennent ainsi en compte la variabilité inter souches. Néanmoins, ils ne permettent en aucun cas la description de cette variabilité. Whiting et Golden (2002) ont estimé les taux de croissance de 17 souches différentes de *E. coli* O157:H7 dans une condition de culture donnée, et ont montré sur ces taux de croissance une variabilité inter souches nettement plus grande que la marge d'incertitude accompagnant la prédiction du logiciel « Pathogen Modeling Program », démontrant ainsi que les données obtenues sur un mélange de souches ne permettaient pas de décrire la variabilité inter souches.

2 Modèles de croissance de type racine carrée

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les modèles de type racine carrée sont rarement construits pour une espèce microbienne donnée, et donc encore moins pour un sous-groupe de cette espèce. Ce sont des modèles généraux, destinés à être utilisés pour toutes les espèces d'intérêt. Divers modèles généraux ont ainsi été proposés pour décrire en particulier l'effet de la température, du pH et parfois d'autres paramètres comme l' a_w sur le taux de croissance des micro-organismes (McMeekin *et al.*, 1993; Rosso *et al.*, 1995; Zwietering *et al.*, 1992; Zwietering *et al.*, 1996). Les modèles proposés sont caractérisés au moins en partie sinon exclusivement (Rosso *et al.*, 1995) par des paramètres qui ont une signification biologique comme les températures cardinales (températures minimale, optimale et maximale de croissance, respectivement T_{min} , T_{opt} et T_{max}), les pH cardinaux (pH minimal, optimal et maximal de croissance, respectivement pH_{min} , pH_{opt} et pH_{max}) et l' a_w minimum (a_{wmin}). Si la forme des modèles proposés est en général valable quelque soit l'espèce microbienne étudiée, les valeurs de leurs paramètres sont elles différentes d'une espèce à l'autre. Dans les simulations réalisées à partir des modèles, on considère bien souvent ces paramètres constants pour une espèce microbienne donnée. Pourtant une variabilité au sein d'une espèce peut exister, voire même au sein d'un sous-groupe d'une espèce.

2.1 Effet de la température

En ce qui concerne l'espèce *E. coli*, il a été dit qu' *E. coli* O157:H7 ne se comportait pas comme les autres *E. coli* s'agissant de l'effet de la température (Doyle and Schoeni, 1984). Ce résultat qui ne portait que sur le test d'une souche a ensuite été contredit par d'autres auteurs (Palumbo *et al.*, 1995; Salter *et al.*, 1998), mais l'idée persiste encore parfois. La comparaison de T_{opt} sur 20 souches de séro-groupe O157 et 12 souches d'autres sérogroupes a montré une différence certes significative, mais sans implication biologique, avec une moyenne de 40,2°C pour le groupe O157 (valeurs allant de 38,5 à 41,5°C) et 41,2°C pour le groupe non O157 (Gonthier *et al.*, 2001). Par ailleurs, Nauta et Dufrenne (1999) ont estimé les températures cardinales sur 75 souches différentes de *E. coli*

O157:H7. Pour T_{opt} , ils ont trouvé des valeurs allant de 37 à 41°C avec une moyenne de 40,1°C, ce qui est concordant avec les résultats de Gonthier *et al.* (2001). Pour T_{min} , des valeurs de 6 à 12°C sont reportées avec une moyenne de 6,3°C et seulement deux valeurs au-dessus de 7°C. Pour T_{max} , des valeurs de 45,5 à 46,5°C ont été reportées avec une moyenne de 45,6°C.

2.2 Effet du pH

Dans les travaux de Nauta et Dufrenne (1999), les valeurs de pH_{min} et pH_{max} ont aussi été estimées sur les 75 souches d' *E. coli* O157:H7 testées. Pour estimer le pH_{min} , les valeurs de pH du milieu ont été expérimentalement ajustées en utilisant de l'acide citrique. Des valeurs allant de 4,1 à 4,35 ont été obtenues avec une moyenne à 4,32. Nauta et Dufrenne ont supposé que la valeur de pH_{opt} était toujours la moyenne entre pH_{min} et pH_{max} et ont uniquement reporté les valeurs de pH_{opt} ainsi calculées, valeurs allant de 6,75 à 6,9 avec une moyenne à 6,88. Nous pouvons à partir de là grossièrement estimer la valeur moyenne de pH_{max} à 9,4.

Il est enfin important de rappeler que le pH_{min} est fortement dépendant de la nature de l'acide utilisé. Un modèle décrivant la relation entre ce pH_{min} et le pKa de l'acide utilisé a été proposé et ajusté notamment pour deux souches de *E. coli* non-STECS (Rosso *et al.*, 1997). Cet ajustement donnait une valeur de 4,2 pour l'acide citrique, valeur qui se situe dans la gamme observée par Nauta et Dufrenne pour les 75 souches de *E. coli* O157:H7. Globalement, plus l'acide est fort, plus le pH_{min} est faible. Ainsi des valeurs de pH_{min} plus élevées sont attendus pour des acides plus faibles. McKellar et Knight (1999) ont estimé le pH_{min} de 19 souches de *E. coli* STECS pour l'acide chlorhydrique et un acide faible, l'acide acétique. Les valeurs de pH_{min} reportées, auxquelles toutes les souches testées sont capables de se multiplier sont de 4,25 pour l'acide chlorhydrique et 5,5 pour l'acide acétique. Néanmoins, ces valeurs ne donnent pas d'indication sur la variabilité observée entre les souches.

2.3 Effet de l' a_w

Dans les travaux de Nauta et Dufrenne (1999), les valeurs d' a_{wmin} ont été estimées sur les 75 souches de *E. coli* O157:H7 testées. L' a_w a été contrôlé par la teneur en NaCl du milieu. Des valeurs d' a_{wmin} allant de 0,952 à 0,958 ont été reportées, avec une valeur moyenne de 0,953.

3 Illustration

A titre d'illustration, ont été représentées sur les figures suivantes (Figure 16 et Figure 17), des valeurs de taux de croissance simulés avec deux modèles de types différents, pour diverses valeurs de température, pH et a_w ou teneur en NaCl. Dans la Figure 16, le modèle publié par Buchanan et Bagi (1994) pour la croissance aérobie a été utilisé. Dans la Figure 17, un modèle de type racine carrée a été utilisé, en fixant les paramètres cardinaux aux valeurs moyennes estimés par Nauta et Dufrenne (1999) ($T_{min}=6,3$, $T_{opt}=40,1$, $T_{max}=45,6$, $pH_{min}=4,3$, $pH_{opt}=6,9$, $pH_{max}=9,4$ et $a_{wmin}=0,953$) et le taux de croissance optimal à partir de la valeur de taux de croissance obtenu par Buchanan et Bagi (1994) dans du bouillon cœur-cervelle sans ajout ni de NaCl ni de $NaNO_2$, à 37°C et un pH de 6,5.

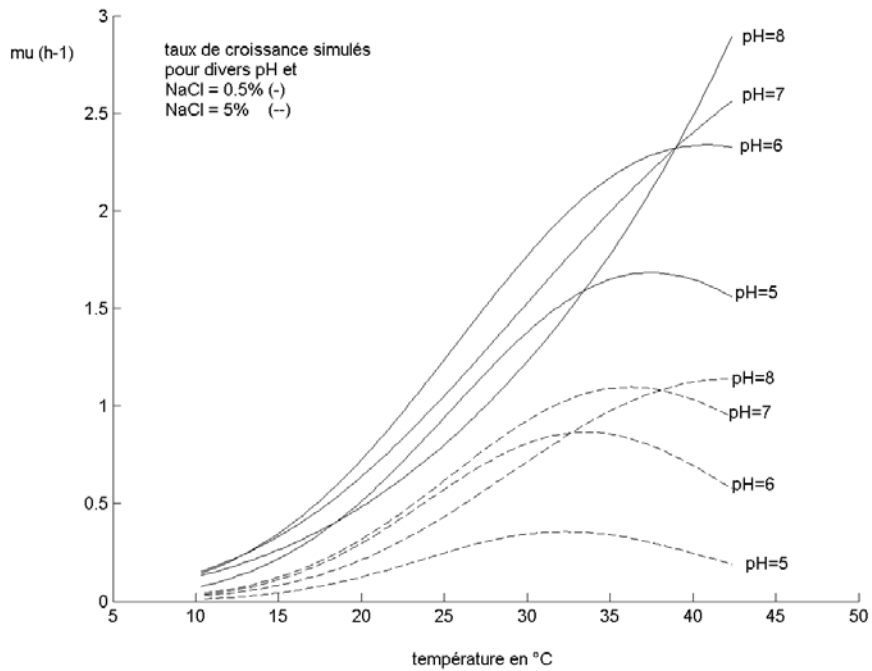


Figure 16 : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec le modèle polynomial de Buchanan et Bagi (1994)

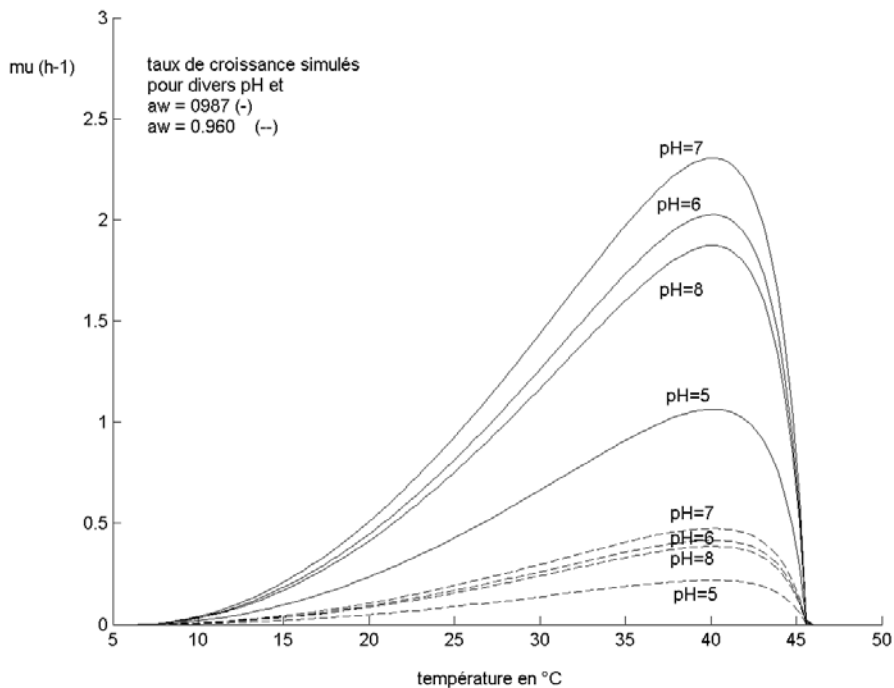


Figure 17 : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec un modèle de type racine carrée

QUESTION N°38 : QUELS SONT LES DIFFERENTS MODELES DECRIVANT L'EFFET DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE TEMPS DE LATENCE ?

Deux approches sont classiquement utilisées pour modéliser le temps de latence. L'approche associée classiquement aux modèles de type polynomiaux consiste à modéliser indépendamment le temps de latence et le taux de croissance, et à utiliser pour construire les modèles décrivant le temps de latence, des données expérimentales obtenues avec des conditions de préculture proches des conditions optimales, c'est-à-dire peu réalistes. Or il a été observé expérimentalement sur diverses espèces bactériennes pathogènes que l'utilisation d'une température de préculture basse, plus réaliste pour les produits réfrigérés, donnait des temps de latence en culture à température basse beaucoup plus faibles (Dufrenne *et al.*, 1997; Membre *et al.*, 1999). Cette approche ne semble donc pas adaptée à la problématique de la microbiologie prévisionnelle. Dans leur essai de validation du modèle utilisé par le « Pathogen Modeling Program » pour prédire la croissance de *E. coli* O157:H7 dans de la viande de bœuf, Walls et Scott (1996) soulignent d'ailleurs cette difficulté pour expliquer les mauvais résultats obtenus en ce qui concerne la prédiction du temps de latence.

La seconde approche, associée le plus souvent aux modèles de type racine carrée, consiste à considérer que pour des conditions de préculture données, le temps de latence est inversement proportionnel au taux de croissance quelque soient les conditions de culture. A partir du moment où l'on dispose d'un modèle pour le taux de croissance, il suffit donc de connaître le produit du taux de croissance par le temps de latence ($\mu_{\max}lag$) pour modéliser le temps de latence. Baranyi et Roberts (1995) ont relié ce produit $\mu_{\max}lag$ à ce qu'ils appellent l'état physiologique initial de la population microbienne. Selon eux, $\mu_{\max}lag$ caractérise le travail à réaliser par la population bactérienne pour s'adapter au nouvel environnement et aboutir à la phase de multiplication cellulaire. Il est néanmoins important de noter que ce produit $\mu_{\max}lag$ n'est constant qu'en première approximation (Delignette-Muller, 1998). D'autre part, il est nécessaire pour prévoir le temps de latence par cette méthode, de connaître les conditions de préculture et de pouvoir quantifier leur effet sur le produit $\mu_{\max}lag$. Des essais de modélisation de l'effet sur le temps de latence de différents stress subis par la population bactérienne en préculture ont été proposés pour *Listeria monocytogenes* (Augustin *et al.*, 2000b; Breand *et al.*, 1999). Ces travaux proposent des approches intéressantes mais montrent aussi la complexité d'une telle modélisation, à laquelle s'ajoute une grande variété de stress susceptibles d'être rencontrés en pratique. D'autre part, l'effet de la taille de l'inoculum sur le temps de latence démontré expérimentalement sur *Listeria monocytogenes* (Augustin *et al.*, 2000a) et de sa phase de croissance (phase exponentielle ou stationnaire) démontré aussi sur *Listeria monocytogenes* (Whiting and Bagi, 2002), rend l'approche encore plus délicate.

En conclusion, aucun modèle général ne permet à l'heure actuelle de prévoir correctement le temps de latence pour *E. coli* sans expérience préalable visant à quantifier l'effet des conditions de préculture dans le cas étudié.

QUESTION N°39 : COMMENT MODELISE-T-ON LA LIMITE CROISSANCE/NON CROISSANCE EN FONCTION DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX?

Ratkowsky et Ross (1995) ont proposé une approche basée sur les modèles de type racine carrée, et permettant de façon indirecte de prendre en compte les interactions entre les facteurs environnementaux au voisinage de la zone limite croissance/non croissance. La démarche proposée permet de décrire la probabilité de croissance d'une population microbienne en fonction de plusieurs facteurs environnementaux, en utilisant les outils classiques de la régression logistique, mais en gardant dans les modèles les paramètres cardinaux présents dans les modèles secondaires de type racine carrée (T_{\min} , pH_{\min} , ...). L'interface croissance/non croissance peut ainsi être précisément décrite. Cette démarche a été utilisée pour décrire l'effet simultané de la température et de la teneur en sel sur l'interface croissance/non croissance d'une souche de *E. coli* STEC non typable (Salter *et al.*, 2000). Elle avait été précédemment utilisée pour décrire l'effet simultané de la température, du pH, de la concentration en acide lactique et de la teneur en sel sur une souche de *E. coli* non STEC (Presser *et al.*, 1998), mais sans que le modèle n'ait été validé sur des souches STEC. Une démarche similaire, mais non basée sur les modèles de type racine carrée, a été utilisée pour décrire l'effet simultané de la température, du pH, de la concentration en acide acétique et de la teneur en sel sur un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7 (McKellar and Lu, 2001).

A titre d'illustration, l'interface croissance-non croissance décrite par le modèle de McKellar et Lu (2001) en fonction de la température et du pH a été représentée pour différentes valeurs de NaCl (dans un milieu sans acide acétique) (Figure 18).

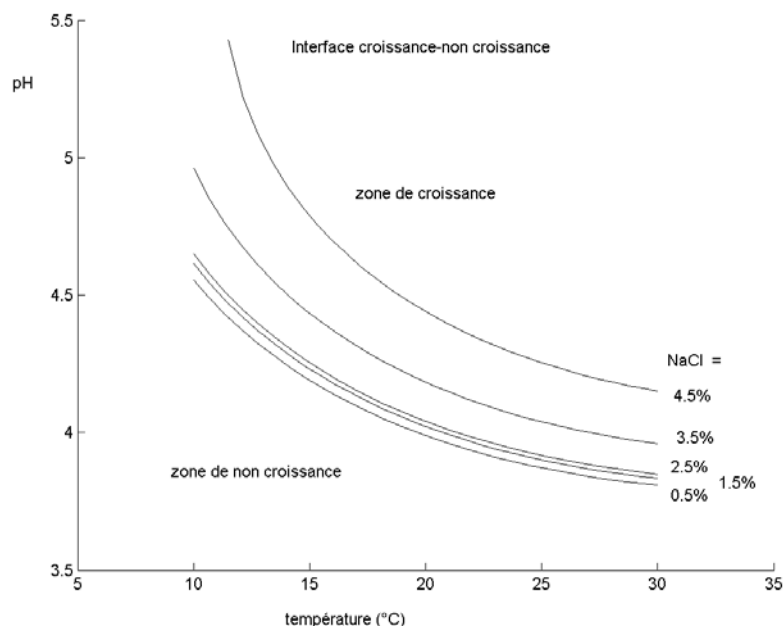


Figure 18 : Interfaces croissance-non croissance décrite par le modèle de McKellar et Lu (2001)

QUESTION N°40 : QUELS SONT LES MODELES D'INACTIVATION THERMIQUE DISPONIBLES?

A l'instar de ce qui concerne la croissance, deux niveaux de modèles sont généralement utilisés pour décrire l'effet de la température sur la survie microbienne :

- un modèle primaire est tout d'abord utilisé pour décrire la cinétique de décroissance microbienne dans un environnement donné, en fonction du temps ;
- un modèle secondaire est ensuite utilisé pour décrire l'effet de la température et éventuellement d'autres facteurs concomitants sur les paramètres du modèle primaire.

Le **modèle primaire** classiquement utilisé en inactivation thermique décrit la relation entre le logarithme du nombre de survivants et le temps de traitement par une droite. Cette relation linéaire est caractérisée parfois par la pente de la droite appelée le taux de destruction (k), mais plus souvent le temps de réduction décimale (D) est utilisé. Ce paramètre D représente le temps de traitement réduisant le nombre de cellules d'un facteur 10 et est directement relié au taux de destruction ($D = \ln(10)/k$). Néanmoins, toutes les courbes d'inactivation thermique observées expérimentalement ne sont pas linéaires, notamment lors de traitements thermiques doux, et il arrive que l'on observe un épaulement en début de cinétique (sorte de temps de latence avant la phase linéaire) et/ou une traînée en fin de cinétique (diminution du taux de destruction après la phase linéaire). De nombreux modèles primaires peuvent alors être utilisés (Geeraerd *et al.*, 2000; Mafart *et al.*, 2002; Peleg, 2000) bien qu'aucun ne semble faire l'unanimité, les pratiques restant très hétérogènes dans ce domaine. Les travaux les plus récents tendent vers l'utilisation soit d'un modèle dérivé du modèle de croissance de Baranyi (Geeraerd *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 1999), soit d'un modèle linéaire en 2 morceaux avec rupture nette entre la phase de latence et la phase linéaire (Juneja *et al.*, 2001; Whiting and Golden, 2002), soit d'un modèle basé sur la loi de Weibull (Mafart *et al.*, 2002; Peleg, 2000). Quelque soit l'approche, les auteurs tentent généralement de retrouver dans les modèles primaires utilisés le paramètre classique k ou D ou un paramètre ayant une signification biologique proche de l'un d'eux.

Le paramètre le plus classiquement modélisé par les **modèles secondaires** proposés est le temps de réduction décimal D. Lorsque seule la température est prise en compte, le modèle de Bigelow (Mafart, 1999) est généralement utilisé. Il décrit le logarithme de la durée de réduction décimale (D) comme une fonction linéaire décroissante de la température. Un de ces paramètres caractéristiques couramment utilisé est z (ou z-value), qui correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire D d'un facteur 10. Contrairement aux modèles de croissance, les modèles de survie sont souvent construits à partir de données expérimentales obtenues directement dans l'aliment. En ce qui concerne *E. coli* O157:H7, deux articles estiment les valeurs de z entre 6 et 7°C dans des viandes hachées de diverses origines animales (Juneja *et al.*, 1997; Juneja and Marmer, 1999) (Tableau 14). Dans un article plus récent, Huang et Juneja (2001) proposent la modélisation de l'effet de la température sur la cinétique d'inactivation thermique décrite par un modèle primaire non linéaire, dans lequel on ne retrouve pas le paramètre classique D. Les paramètres du nouveau modèle proposé n'ont pas de signification biologique claire. Des modèles polynomiaux sont utilisés pour décrire l'effet de la température sur chacun d'eux. D'après les auteurs, ce modèle décrit mieux les données que l'approche classique (modèle de Bigelow sur D), néanmoins il n'a pas été testé en validation sur d'autres données, et on peut craindre qu'il soit moins robuste que le modèle classique du fait de son plus grand nombre de paramètres.

Tableau 14 : Modèles secondaires d'inactivation thermique proposés pour *E. coli* O157:H7

Variable décrite	Modèle	Facteurs étudiés et gammes de variation	Milieu étudié	Référence
$\log_{10}(D)$	polynomial (10 paramètres)	T (°C) [54,5 – 64,5] pH [4,2 – 9,6] NaCl (%) [0,5 – 8,5]	milieu TSB	(Blackburn <i>et al.</i> , 1997)
k et a paramètres d'un modèle primaire non linéaire	polynomial (6 paramètres)	T (°C) [55 – 65]	viande hachée de bœuf	(Huang and Juneja, 2001)
$\log_{10}(D)$	Bigelow (2 paramètres)	T (°C) [55 – 65]	viande hachée de dinde, agneau et porc	(Juneja and Marmer, 1999)
$\log_{10}(D)$	Bigelow (2 paramètres)	T (°C) [55 – 65]	viande hachée de poulet et bœuf	(Juneja <i>et al.</i> , 1997)
$\log_{10}(D)$	polynomial (6 paramètres)	T (°C) [40 – 60] acide benzoïque ou acide malique (mg/L) [200 – 1000]	jus de pomme	(Splittstoesser <i>et al.</i> , 1996)

Parfois, l'effet d'autres facteurs associés à la température est pris en compte dans les modèles secondaires. En ce qui concerne *E. coli* O157:H7, deux modèles polynomiaux ont été proposés pour décrire l'effet associé d'autres facteurs sur le logarithme de D (Tableau 14), l'un prenant en compte le pH et la teneur en NaCl (Blackburn *et al.*, 1997) et l'autre prenant en compte la teneur en acide benzoïque ou en acide malique, conservateurs du jus de pomme (Splittstoesser *et al.*, 1996). D'autres travaux prenant en compte d'autres facteurs concomitants ont été réalisés sur des souches de *E. coli* non-STEC, sans que l'on sache si les modèles obtenus sont utilisables ou non sur les STEC.

Whiting et Golden (2002) ont évalué les temps de réduction décimale de 17 souches de *E. coli* O157:H7 cultivées en bouillon à respectivement 55 et 60°C. Ils ont observé des variations importantes entre souches, avec des coefficients de variation entre souches de 42 % à 55°C et de 33 % à 60°C. Les modèles exposés précédemment ne prennent pas en compte ces variabilités.

QUESTION N°41 : QUELS SONT LES MODELES D'INACTIVATION NON-THERMIQUE DISPONIBLES?

En ce qui concerne les modèles d'inactivation non thermique, les travaux publiés jusque là sont très disparates et semblent répondre à des problèmes technologiques très particuliers. Tous les modèles publiés pour *E. coli* O157:H7 ont été construits à partir de données observées dans l'aliment, et dans des aliments bien spécifiques (salami, salade d'aubergines, poivron vert..., Tableau 15). On peut aussi observer dans le Tableau 15, la grande diversité des facteurs pris en compte. Certains auteurs utilisent la modélisation à deux niveaux (Skandamis and Nychas, 2000; Tsujihata *et al.*, 1998), et décrivent par des modèles secondaires polynomiaux l'effet des différents facteurs étudiés sur le taux de destruction (k) et éventuellement le temps de latence, utilisant les mêmes modèles primaires qu'en inactivation thermique. D'autres auteurs modélisent en une seule étape le taux de réduction microbienne en fonction de différents facteurs dont le temps de traitement, toujours en utilisant des modèles polynomiaux (Han *et al.*, 2001; Pond *et al.*, 2001). Enfin, Uljas *et al.* (2001) utilisent un modèle de régression logistique pour décrire l'effet de plusieurs facteurs dont le temps de traitement sur la probabilité d'obtention d'une réduction microbienne supérieure à 5 log₁₀.

Aucune démarche classique de modélisation de l'inactivation non thermique ne se dégage donc de ces travaux récents et très disparates.

Tableau 15 : Modèles d'inactivation non thermiques proposés pour *E. coli* O157:H7

Variable décrite	Modèle	Facteurs étudiés et gammes de variation	Milieu étudié	Référence
log ₁₀ (réduction microbienne)	polynomial (15 paramètres)	ClO ₂ gazeux (mg/L) [0,1 – 0,5] humidité (%) [55 – 95] temps (min) [7 – 135]	poivron vert	(Han <i>et al.</i> , 2001)
log ₁₀ (réduction microbienne)	polynomial (6 paramètres)	a _w , pH, temps gammes de variation non précisées	salami	(Pond <i>et al.</i> , 2001)
temps de latence et taux de destruction (en log)	polynomial (14 paramètres)	T (°C) [0 – 15] pH [4 – 5] huile essentielle d'origan (%) [0 – 2,1]	salade d'aubergines	(Skandamis and Nychas, 2000)
taux de destruction (en log)	polynomial (11 paramètres)	T (°C) [10 – 50] NaCl (%) [0 – 1,5] acide acétique (%) [0,5 – 2,5]	vinaigre	(Tsujihata <i>et al.</i> , 1998)
Probabilité d'obtention d'une réduction supérieure à 5 log ₁₀	régression logistique (5 paramètres)	T (°C) [5 – 35] pH [3,1 – 4,3] temps (h) [0 – 12] sorbate de potassium ou benzoate de sodium (%) [0 – 0,1]	cidre de pomme	(Uljas <i>et al.</i> , 2001)

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Validation des modèles existants sur des *E. coli* STEC non-O157:H7 et caractérisation de la variabilité intra et inter sérogroupes.
- ➔ Modélisation de l'effet des conditions de culture et de préculture sur le temps de latence.
- ➔ Validation et confrontation des différents modèles de la limite croissance-non croissance.
- ➔ Proposition et validation d'une nouvelle approche de modélisation de l'inactivation thermique et non thermique : développement de modèles intégrant des paramètres ayant un sens biologique et prenant en compte la diversité des formes de cinétiques observées.

Section I : Relation dose-réponse

Responsable de section : V. Leclerc

Rédacteurs : M.L. Delignette-Muller – V. Leclerc – P. Pardon

POINTS A RETENIR

- L'établissement de la relation entre la quantité de cellules microbiennes ingérées (la dose) et la probabilité de maladie (la réponse) fait partie de « l'appréciation des effets », qui est l'une des étapes d'un processus plus global « d'appréciation des risques » dont un des objectifs est de renforcer la sécurité des consommateurs. Cette étape doit être basée sur des informations scientifiques et fait appel à de nombreuses compétences.
- L'établissement de la relation dose-réponse doit prendre en compte des facteurs liés au micro-organisme, au vecteur de contamination et à l'hôte.
- L'établissement de la relation dose-réponse nécessite l'utilisation d'un modèle mathématique construit sur la base de données provenant d'infections expérimentales animales ou humaines. Le modèle mathématique doit ensuite être validé à partir de données issues d'épidémies.
- Sur la base des données actuellement disponibles pour les STEC, il est difficile de mettre en avant un modèle dose-réponse particulier. La qualité des données microbiologiques et épidémiologiques servant à valider les modèles doit encore être améliorée. Pour cela, les protocoles d'investigations de toxi-infections alimentaires collectives ou d'épidémies doivent être complétés et valorisés.
- Selon les résultats rapportés par les enquêtes épidémiologiques, la quantité de cellules ingérées entraînant la maladie semble être plutôt faible (quelques cellules à plusieurs centaines de cellules). Toutefois, la qualité des données recueillies en terme de dénombrement ou de caractérisation de la population infectée suggère de rester prudent sur l'attribution de valeurs plus précises.
- Dans ce contexte d'établissement de la relation dose-réponse, il est primordial d'être transparent et critique. Les modalités de recueil des données et les hypothèses biologiques posées doivent être clairement définies et cohérentes avec la réalité.

QUESTION N°42 : QUEL EST LE CONTEXTE DE L'ETABLISSEMENT DE LA RELATION DOSE-REPOSE ?

1 Relation dose-réponse et analyse des risques

Les STEC constituent un danger microbiologique susceptible de représenter un risque pour la santé publique. Ce risque peut être plus ou moins important au sein de la population générale et il est utile de le caractériser en réalisant, dans la mesure du possible, une appréciation quantitative des risques.

Selon le *Codex Alimentarius* (Anonyme, 2002b), l'appréciation quantitative des risques est composée de 4 étapes qui sont l'identification du danger, l'appréciation de l'exposition, l'appréciation des effets, et l'estimation des risques. Dans le contexte de cette section, c'est l'étape d'appréciation des effets qui sera concernée puisque, dans une situation idéale, elle repose sur la relation dose-réponse (Anonyme, 1999a). La réalisation d'une appréciation des risques devrait être transparente et fondée sur des éléments scientifiques solides.

Enfin, l'appréciation des risques s'inscrit dans un processus plus global d'analyse des risques qui est lui-même constitué de 3 étapes (appréciation des risques, gestion des risques et communication à

propos des risques). La partie appréciation des risques nécessite des compétences nombreuses et variées et représente un élément clé destiné aux gestionnaires du risque.

2 Données théoriques nécessaires à l'établissement de la relation dose-réponse

L'étape d'appréciation des effets fournit une description qualitative ou quantitative de la nature et de la gravité des effets néfastes pouvant résulter de l'ingestion d'un micro-organisme ou de ses toxines. Au cours de cette étape, il convient donc de prendre en compte plusieurs facteurs importants liés à la fois au micro-organisme, à la matrice contaminée et à l'hôte (Anonyme, 1999a).

En ce qui concerne les micro-organismes, la virulence et le caractère infectieux peuvent varier en fonction de leur interaction avec l'hôte et l'environnement. Le matériel génétique peut être transféré d'un micro-organisme à un autre entraînant ainsi le transfert de caractéristiques telles que la résistance aux antibiotiques et les facteurs de virulence. Les pathogènes peuvent se propager par une voie de transmission secondaire et l'apparition de symptômes cliniques peut être retardée après l'exposition. Les caractéristiques de la matrice contaminée, comme par exemple la haute teneur en graisse d'un véhicule alimentaire, peuvent également moduler la capacité des bactéries à atteindre et coloniser l'intestin.

En ce qui concerne l'hôte, certains éléments peuvent être importants. Il s'agit, par exemple, des facteurs génétiques tels que le type d'antigène d'histocompatibilité, l'âge, l'état nutritionnel, la prise de médicaments, les infections simultanées, l'état immunitaire et les expositions antérieures. Ainsi, dans ce contexte, certains individus peuvent être infectés, par des agents pathogènes, sans présenter de symptômes tandis que, pour d'autres, de faibles doses de ces mêmes pathogènes peuvent provoquer des affections aiguës.

Dans une situation idéale, l'appréciation des effets doit permettre d'établir une relation entre la dose d'agents pathogènes ingérée et l'effet chez l'individu contaminé (infecté ou malade). En l'absence d'une relation dose-réponse connue, il est possible de recourir à des avis d'experts pour analyser les divers facteurs nécessaires à l'appréciation des effets. En outre, les experts peuvent être en mesure de concevoir des systèmes de classement permettant de caractériser le degré de gravité et/ou la durée de la maladie.

3 Approche pratique utilisée pour modéliser la relation dose-réponse

Plusieurs modèles mathématiques sont disponibles pour estimer la probabilité (P) de l'apparition de l'infection ou de la maladie suite à l'ingestion d'une dose (D) d'un agent pathogène. Ces modèles prennent en compte un nombre de paramètres plus ou moins importants et des hypothèses variées. Ils ont été développés grâce à des études sur des modèles animaux ou sur des volontaires humains. A notre connaissance et en ce qui concerne les STEC, aucune donnée obtenue à partir de volontaires humains n'est disponible. Les auteurs qui ont proposé des modèles pour la relation dose-réponse de *E. coli* O157:H7 se sont donc fondés soit sur des données expérimentales chez l'animal, soit sur des données expérimentales chez l'homme mais concernant d'autres bactéries proches (*EPEC* et *Shigella*). Une fois ces modèles mathématiques établis, des données provenant d'investigations d'épidémies sont utilisées pour comparer le résultat obtenu en conditions réelles (plus ou moins bien définies) au résultat estimé avec le modèle étudié.

Les modèles dose-réponse ne sont pas tous équivalents. Quelques-unes des caractéristiques recherchées pour un modèle concernent son adéquation avec les données provenant de la littérature, sa simplicité (sans toutefois sacrifier à sa qualité), son adaptabilité à une grande diversité de conditions et sa flexibilité pour s'adapter à plusieurs pathogènes différents (Holcomb *et al.*, 1999).

Les modèles mathématiques utilisés pour décrire la relation dose-réponse peuvent être classés en deux principales catégories :

- des modèles mécanistes basés sur des hypothèses biologiques ;
- des modèles empiriques construits uniquement pour ajuster les données observées.

Parmi les **modèles mécanistes**, deux modèles sont couramment utilisés, le modèle exponentiel et le modèle Bêta-Poisson (Haas *et al.*, 1999). Ces deux modèles sont basés sur l'hypothèse qu'une seule bactérie est susceptible d'infecter l'hôte, mais avec une probabilité très faible, et sur l'hypothèse d'absence d'effet coopératif des bactéries. Ces modèles s'opposent donc à la définition d'une dose minimale infectante (DMI⁵). Lorsque le nombre de bactéries augmente, la probabilité que chaque bactérie franchisse tous les obstacles conduisant à l'infection de l'hôte est inchangée. Par contre la probabilité globale qu'au moins une des bactéries y arrive est naturellement augmentée.

Le **modèle exponentiel** est le plus simple des deux modèles. Il comporte un seul paramètre (r) qui est la probabilité d'infection de l'hôte par une bactérie. Le modèle Bêta-Poisson à deux paramètres est une extension du modèle exponentiel, incorporant une variabilité sur le paramètre r par l'intermédiaire d'une distribution Bêta sur r . Cette distribution décrit globalement la variabilité de sensibilité de l'hôte et de virulence de la bactérie. Ce modèle permet de décrire la plupart des courbes dose-réponse observées expérimentalement pour diverses bactéries hôtes et est de ce fait couramment utilisé (Haas, 1983; Teunis *et al.*, 1999). Un modèle empirique encore plus flexible est le modèle de Weibull-Gamma, qui comprend 3 paramètres. Des études comparant divers modèles sur divers jeux de données ont montré qu'il était le seul suffisamment flexible pour ajuster correctement tous les jeux de données (Holcomb *et al.*, 1999). D'un point de vue mathématique, les trois modèles (exponentiel, Bêta-Poisson et Weibull-Gamma) sont emboîtés. Ceci signifie que le modèle exponentiel est un cas particulier d'un modèle Bêta-Poisson qui est lui-même un cas particulier du modèle Weibull-Gamma. De ce fait, il est facile de comparer statistiquement les trois modèles sur un jeu de données.

QUESTION N°43 : QUELLES SONT LES PRINCIPALES EVALUATIONS DE RELATIONS DOSE-REPONSE REALISEES POUR LES STEC ?

L'investigation d'une épidémie liée à *E. coli* O157, suite à un camp scout installé dans le Nord-Est de l'Ecosse, a été l'occasion d'estimer une DMI. Par la suite, ces données d'investigation ont été utilisées pour comparer l'ajustement de deux modèles Bêta-Poisson (Strachan *et al.*, 2001; Strachan *et al.*, 2002). Dans ce contexte, 300 brebis et agneaux ont occupé environ 92 000 m² de pâture pendant 6 jours. Les animaux ont été retirés du terrain tandis qu'un camp scout s'est installé pour 2 jours (pluies abondantes au 2^{ème} jour). Pour les auteurs, l'infection des scouts est due à l'ingestion de particules de terre. Pour estimer la dose infectieuse, ceux-ci ont fait 2 hypothèses. La première concerne le fait que le nombre de cellules de *E. coli* excrétées par les 28 animaux testés (prélèvements et dénombrements réalisés 3 semaines après le camp scout) est représentatif du niveau d'excrétion (3 semaines avant) des 272 autres animaux non testés. La seconde hypothèse concerne le fait que les fèces, et donc les cellules de *E. coli* O157, sont uniformément répartis dans le 1^{er} cm² de la surface du sol. Ensuite, afin d'estimer le nombre de cellules de *E. coli* O157 présentes dans le sol au moment de l'installation du camp, les auteurs ont utilisé les résultats issus de 4 publications décrivant le devenir des *E. coli* O157 dans les fèces/purin de bovins et le temps de réduction décimale à la température de +5°C. La quantité de sol ingéré ayant été estimée entre 30 et 200 mg/24 heures (van Wijnen *et al.*, 1990), la DMI a été estimée entre 4 et 24 cellules de *E. coli* O157 (très peu d'informations sur les modalités de dénombrement étaient données). Cette valeur a ensuite été utilisée dans 2 modèles Bêta-Poisson pour calculer la probabilité d'infection et comparer ce résultat avec le taux d'attaque réellement retrouvé. Le premier modèle mathématique a été développé à partir de données liées à l'ingestion de *Shigella* par des volontaires humains (Crockett *et al.*, 1996) et le second est basé sur la réponse de jeunes lapins suite à l'ingestion de 1 mL d'une suspension contenant entre 1.10^5 et 1.10^{10} cellules de *E. coli* O157 (Haas *et al.*, 2000). Dans ces conditions, les auteurs concluent que les données provenant du camp scout (taux d'attaque de 0,08 pour 4 à 24 *E. coli* O157 ingérés) sont ajustées au modèle de Crockett (1996).

Haas *et al.* (2000) utilisent, eux, un jeu de données expérimentales sur des lapins âgés de 2 à 3 jours pour ajuster un modèle Bêta-Poisson. Ils tentent de valider l'utilisation de ce modèle à partir de données épidémiologiques humaines (Keene *et al.*, 1997; Warrner *et al.*, 1996). Dans le cadre de leur

⁵ La notion de dose infectieuse sera utilisée dans le contexte des investigations d'épidémies ou d'infections expérimentales / accidentelles. En effet, dans ces cas, la détermination de la dose infectieuse ne résulte pas d'une modélisation mathématique mais d'une numération (plus ou moins fiable) du nombre de pathogènes ingérés et ayant provoqué un effet chez l'hôte (infection asymptomatique ou apparition de symptômes).

étude, ils montrent que les paramètres du modèle Bêta-Poisson obtenu à partir d'expérimentations réalisées sur de jeunes lapins sont plus proches de ceux ajustés sur des données humaines concernant des EPEC que de ceux ajustés sur des données humaines concernant l'espèce *Shigella* (Crockett *et al.*, 1996). A titre indicatif, les doses rendant malades 50 % des individus (N_{50}) sont respectivement d'environ 6.10^5 , 3.10^6 et 10^3 cellules pour les données *E. coli* O157:H7 sur les jeunes lapins, EPEC sur l'homme et *Shigella* sur l'homme.

Un modèle Bêta-binomial a également été développé (Cassin *et al.*, 1998). Ce modèle mathématique provient du modèle Bêta-Poisson dont il reprend les hypothèses de base ainsi que les 2 paramètres. Mais contrairement au modèle Bêta-Poisson qui définit un risque moyen pour la population, le modèle Bêta-binomial permet de prendre en compte la variabilité concernant la probabilité d'être malade pour une dose ingérée (Figure 19). Lors du paramétrage du modèle, Cassin *et al.* (1998), émettent l'hypothèse que la virulence de *E. coli* O157:H7 est similaire à celle de *Shigella dysenteriae*. Le choix des paramètres α et β est basé sur des données provenant de 3 études pour lesquelles des volontaires humains ont été contaminés avec deux espèces de *Shigella* (Crockett *et al.*, 1996).

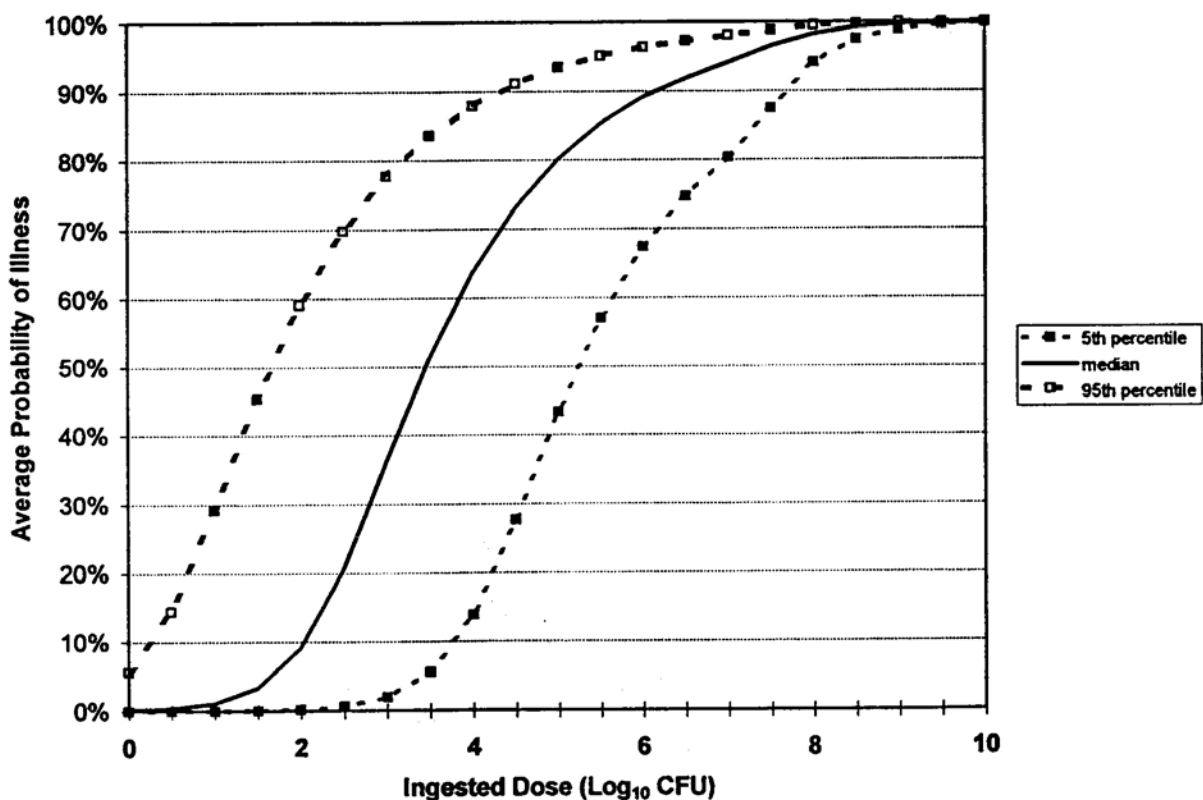


Figure 19 : « Beta-Binomial dose-response model - Uncertainty in average probability of illness vs ingested dose of *E. coli* O157:H7. » Traduit par l'Afssa en : Modèle dose-réponse Bêta-Binomial incluant la variabilité en ce qui concerne la probabilité d'être malade selon la dose ingérée de cellules de *E. coli* O157:H7(d'après Cassin *et al.*, 1998 avec l'autorisation d'Elsevier)

Powell *et al.* (2000) proposent une démarche quelque peu différente. Ils décrivent la loi dose réponse de *E. coli* O157:H7 non pas par une courbe unique, mais par une enveloppe de courbes, indiquant la zone d'incertitude sur la relation dose-réponse (Figure 20). L'enveloppe proposée est définie d'un côté par un modèle Bêta-Poisson ajusté sur des données humaines associées à des *Shigella* et de l'autre côté par un modèle Bêta-Poisson ajusté sur des données humaines avec des EPEC. Les auteurs considèrent ainsi que du fait que *E. coli* O157:H7 partage des facteurs de virulence à la fois avec les EPEC et les *Shigella*, sa relation dose-réponse doit se situer entre les 2 relations dose-réponse obtenues pour les EPEC et les *Shigella*. De plus, les auteurs proposent une estimation de courbe la plus probable pour *E. coli* O157:H7 calculée par simulation de type « Monte Carlo » réalisée à partir de données épidémiologiques humaines. Cette courbe la plus probable estimée se trouve à peu près au centre de l'enveloppe définie précédemment.

A titre indicatif, les doses N_{50} estimées sont d'environ 7.10^2 , 2.10^5 et 7.10^7 cellules pour, respectivement, la borne correspondant à *Shigella*, la courbe la plus probable et la borne correspondant aux EPEC. Les auteurs considèrent, qu'étant donné le manque de données relatives à *E. coli* O157:H7, il est plus raisonnable de considérer cette enveloppe dans les appréciations quantitatives des risques que de considérer une courbe dose-réponse unique très grossièrement validée par des données épidémiologiques. Ils soulignent que cette enveloppe sous-estime même peut-être encore l'incertitude sur cette relation, du fait par exemple que les données humaines concernant les EPEC et les *Shigella* n'ont été obtenues que sur de jeunes hommes en bonne santé, qui ne sont pas représentatifs de la population générale.

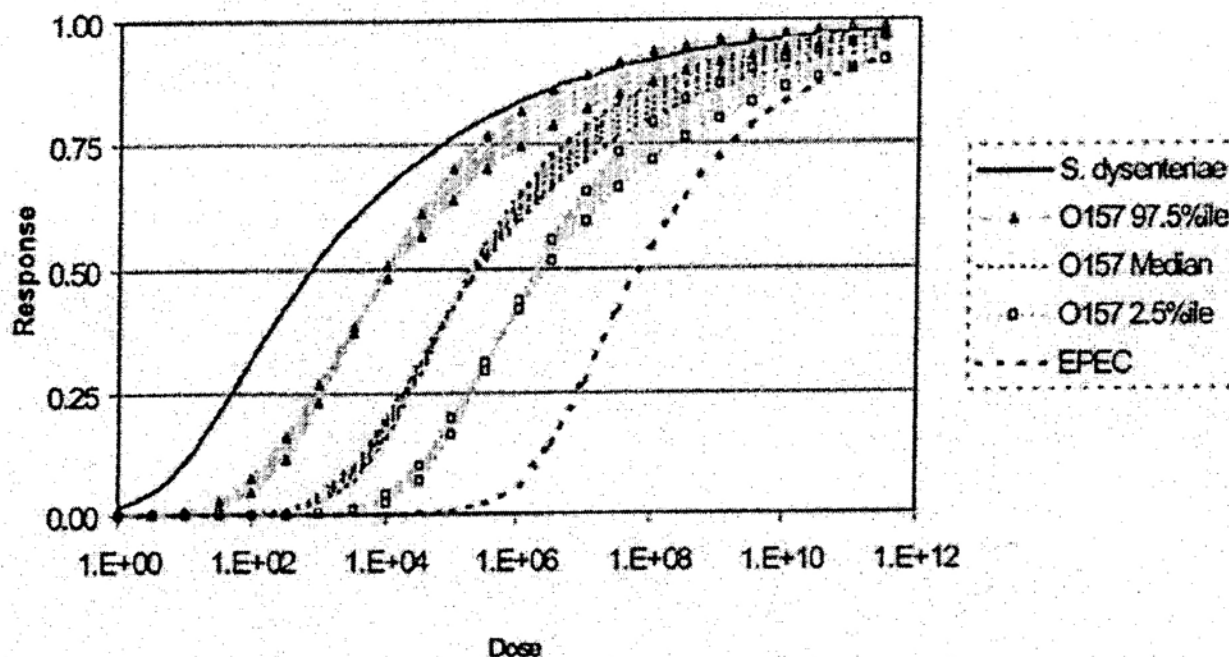


Figure 20 : Enveloppe de la relation dose-réponse pour *E. coli* O157:H7. Les limites de cette enveloppe sont définies par la relation dose-réponse ajustée sur des données humaines associées à *Shigella* ou à des EPEC (d'après Powell *et al.*, 2000)

Nauta *et al.* (2001) ont comparé 5 relations dose-réponse (Figure 21) sur la base de données provenant d'une épidémie liée à *E. coli* O157:H7 qui s'est produite en septembre 1996 au Japon (Shinagawa, 1997). Les données recueillies étaient très intéressantes puisque l'école primaire dans laquelle s'était produite l'épidémie représentait une communauté bien définie. Le nombre et la caractérisation des personnes exposées étaient donc bien connus. De plus, il était possible de collecter les fèces de tous les participants au repas et donc de connaître le nombre de malades infectés et de non malades. Les services de restauration avaient également conservé une partie des aliments distribués pendant 15 jours ce qui a permis de réaliser un dénombrement par la méthode du NPP (il ne semble pas y avoir d'information disponible en ce qui concerne l'historique temps-température des repas servis et des plats conservés pour l'analyse). Enfin, la quantité d'aliment ingérée était relativement bien appréciée puisque les portions servies en collectivités sont homogènes. Sur la base de ces connaissances, les auteurs ont tout d'abord estimé le nombre le plus probable de pathogènes présents dans les aliments analysés : 4 à 18 ufc/100g selon les échantillons. Ils ont ensuite calculé la moyenne arithmétique : 11 ufc/100g. Connaissant les quantités de produits mangés par les enfants (225 à 320g, 280g en moyenne), ils ont pu estimer les doses moyennes ingérées par les enfants infectés. Le résultat, soit 208 enfants infectés sur 828 participants au repas et 31 *E. coli* O157:H7 ingérés en moyenne par enfant, a ensuite été utilisé pour tester l'ajustement des estimations liées aux modèles hypergéométrique, exponentiel et Bêta-Poisson. Pour ces auteurs, les modèles Bêta-Poisson de Haas *et al.* (2000) sur des STEC O157 chez des lapins et de Powell *et al.* (2000) sur des EPEC et *Shigella dysenteriae* sur des humains, ne sont pas ajustés à cette donnée épidémique. Les auteurs précisent toutefois qu'il s'agissait, à la fin de l'année 2000 et à leur connaissance, de la seule épidémie liée aux STEC O157 à être clairement documentée sur la dose ingérée ainsi que le nombre de personnes exposées malades ou non malades.

Les auteurs espèrent que, dans le futur, d'autres données de ce type deviendront disponibles et permettront de mieux prendre en compte des facteurs complémentaires (sensibilité de l'hôte, par exemple). Sur la base du modèle exponentiel, la probabilité d'infection (P_{inf}) est estimée à environ 0,01 par *E. coli* O157:H7 ingéré.

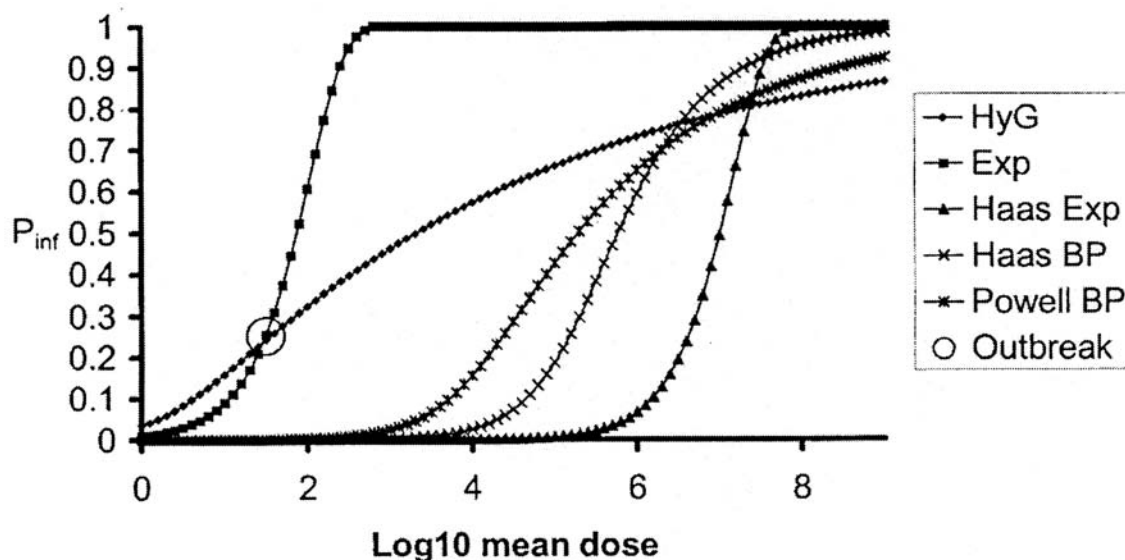


Figure 21 : Ajustement de 5 relations dose-réponse sur la base de données provenant d'une épidémie japonaise liée à *E. coli* O157:H7 en 1996. Le cercle représente la valeur provenant de l'épidémie ($P_{inf} = 0.25$, dose moyenne ingérée = 1,49 \log_{10}). Cette valeur est ajustée aux modèles hypergéométrique et exponentiel (d'après Nauta *et al.*, 2001)

QUESTION N°44 : DE QUELLES DONNEES DISPOSE-T-ON POUR EVALUER LA DOSE INFECTIEUSE ?

D'autres données n'ayant pas été utilisées pour valider les relations dose-réponse ont été recueillies dans le but d'évaluer la dose infectieuse de diverses souches de *E. coli* pathogènes. Ces données sont issues de cas humains (épidémies, infections volontaires ou accidentelles) et d'infections animales expérimentales.

1 Données provenant d'épidémies

Entre novembre 1992 et février 1993, plus de 700 personnes ont été malades (dont 4 morts) après ingestion de viande de bœuf contaminée par *E. coli* O157:H7 (Tuttle *et al.*, 1999). L'infection a été associée à la consommation de hamburgers provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Pour l'Etat de Washington où la plupart des cas se sont produits, une enquête de suivi de la production et de la distribution ainsi qu'une discussion avec chaque gérant de restaurant a permis de montrer que la majorité des steaks hachés liés aux cas avaient été préparés puis congelés le 19 novembre 1992. Dans 3 autres Etats touchés, les steaks hachés ont été préparés à des moments différents au cours des journées des 19 et 20 novembre 1992. Sur les 34 lots produits les 19 et 20 novembre 1992, 21 lots ont été testés pour la recherche de *E. coli* O157:H7. Parmi les 7 lots détectés positifs, 6 ont permis d'obtenir une valeur de dénombrement en utilisant la méthode du nombre le plus probable à 3 tubes. A partir des valeurs maximales retrouvées par les auteurs, il est avancé que la dose infectieuse est inférieure à 700 bactéries (l'intervalle de confiance, non donné, est de 225-6750 ufc/g). Les auteurs suggèrent que cette valeur, la plus probable, pourrait être inférieure en raison de la cuisson avant consommation et en raison des 5 autres valeurs de dénombrement plus faibles également retrouvées. Ils mettent également en avant que la production ayant été importante, il est possible que de nombreux lots, non testés, aient pu être plus fortement contaminés.

Par contre, les auteurs ne tiennent pas compte du fait que les échantillons ont été congelés et ils partent de l'hypothèse qu'une cellule stressée sera systématiquement détectée après enrichissement - principe de la méthode NPP - en bouillon tryptone-soja modifié. De plus, aucune information n'est disponible en ce qui concerne la quantité de viande ingérée par les consommateurs. Enfin, la publication ne semble pas prendre en compte le statut des malades : âge, types et sévérité des symptômes, traitements médicamenteux, infection concomitante, immuno-dépression, etc...

2 Données provenant d'infections volontaires ou accidentelles sur des humains

Une étude a été réalisée sur 24 volontaires ayant ingéré l'une des 2 souches EPEC isolées de malades atteints de diarrhées (Mathewson *et al.*, 1986). Ces 2 souches ont des profils d'adhérence différents et ont été absorbées à des niveaux de 7.10^8 et 1.10^{10} *E. coli* par volontaire. Dans cette étude, plus la capacité d'adhérence des souches est élevée, plus le nombre de volontaires atteints de diarrhées est important. Les résultats montrent que, quelle que soit la souche et les doses ingérées, tous les volontaires excrètent la bactérie dans leurs fèces. Cependant, seuls 6 volontaires sur 24 présentaient au moins 2 ou 3 diarrhées sur une période de 24 heures.

Une technicienne de 46 ans a été contaminée en laboratoire (Burnens *et al.*, 1993). Cette personne réalisait des essais de cytotoxicité à partir d'une culture de *E. coli* O157:H7 incubée une nuit (souche isolée 6 mois auparavant chez un petit garçon de 6 ans victime de gastro-entérite). Quatre jours plus tard la technicienne était victime de diarrhées sanglantes sévères et de crampes abdominales. Les analyses de selles ont permis de retrouver des *E. coli* O157:H7 de façon abondante et aucun autre pathogène n'a été retrouvé. Pour les auteurs, les souches retrouvées chez la technicienne et chez l'enfant étaient vraisemblablement les mêmes. Les auteurs n'ont pas mis en évidence d'erreurs de contamination par la technicienne et proposent donc de rester prudents en supposant que le nombre de *E. coli* O157:H7 capable de produire une infection humaine est faible.

3 Données provenant d'infections expérimentales d'animaux

Pour des bovins adultes en bonne santé et artificiellement contaminés par *E. coli* O157:H7, la DMI est supérieure à 1.10^4 et probablement supérieure ou égale à 1.10^7 . La plupart des bovins infectés ne montre pas de signe clinique et une première infection ne permet pas de prévenir une ré-infection par la même souche (Cray and Moon, 1995).

Deux des 17 veaux exposés à de faibles doses ($<3.10^2$ *E. coli* O157:H7) et 3 des 4 veaux exposés à de fortes doses ($<1.10^4$ *E. coli* O157:H7) ont excrété, dans leurs fèces, la souche inoculée (Besser *et al.*, 2001). L'ingestion d'un litre d'eau contaminée avec 1.10^3 à 1.10^4 cellules de *E. coli* O157:H7/mL permet de retrouver 10 veaux testés excréteurs de *E. coli* sur 12 (Shere *et al.*, 2002). Le nombre de doses nécessaire à l'initiation de l'excrétion varie selon les veaux et 2 d'entre-eux n'étaient toujours pas excréteurs après l'ingestion de 4 doses (1.10^6 ufc par dose).

Pour des lapins âgés de 3 jours, artificiellement contaminés par *E. coli* O157:H7 (souche fortement productrice de Shiga-toxines), une diarrhée ne se développe systématiquement qu'avec 1.10^8 cellules de *E. coli* (Pai *et al.*, 1986). Pour la souche faiblement productrice de Shiga-toxines, les diarrhées ne sont observées que de façon irrégulière même avec un nombre de *E. coli* plus élevé. Lors de ces essais, *E. coli* O157:H7 est retrouvé en plus grande concentration dans le côlon que le petit intestin et les symptômes cliniques sont corrélés avec la présence de Shiga-toxines libres dans le côlon.

Sur des souris traitées à la streptomycine, une souche de *E. coli* O91:H21, qui produit les Shiga-toxines 1 et 2, est extrêmement virulente lorsque qu'elle est administrée par voie orale (LD50 <10 organismes) (Lindgren *et al.*, 1994).

E. coli O157 est capable de coloniser le tractus intestinal de rats adultes après inoculation par gavage de 1.10^9 à 1.10^{10} ufc par animal (Garssen *et al.*, 1998). Un régime alimentaire plus léger et une neutralisation de l'acidité gastrique avec du bicarbonate de sodium pendant une nuit favorise la colonisation du tractus intestinal sans toutefois provoquer de signes cliniques. L'exposition de rats adultes par gavage résulte en une colonisation du tractus gastro-intestinal qui est dose-dépendante (Havelaar *et al.*, 2000). *E. coli* O157 K-H- (*eae+*, *stx2+*) infecte 2/3 des animaux pour une dose de $5.7.10^3$ ufc par animal. Par contre, aucun des 3 animaux testés n'est infecté pour une dose de 50 ufc par animal. Sur les trois pathogènes testés (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *E. coli* O157 et *Campylobacter jejuni*), *E. coli* est moins infectieux que *Campylobacter* mais l'est plus que *Salmonella*.

Il existe une très grande variabilité en terme de résultats obtenus. Cette disparité est liée aux modèles animaux utilisés (rats, bovins, lapins, souris), à l'âge des animaux (bovins adultes, veaux, rats adultes, jeunes lapins), aux traitements subis (gavage, neutralisation de l'acidité gastrique, pré-traitement antibiotique) et aux doses ingérées (50 à 1.10^{10} ufc/g). Il est impossible de tirer des conclusions si ce n'est, qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèles animaux transposables à l'homme.

QUESTION N°45 : QUELLES SONT LES PRINCIPALES LIMITES LIEES A L'EVALUATION DE LA RELATION DOSE-REPONSE ?

1 Limites liées à l'utilisation de modèles mathématiques

Comme ceci est mis en évidence dans les paragraphes précédents, le type de modèle mathématique mis en oeuvre, les modèles animaux ou humains et le pathogène utilisé lors des essais d'infections expérimentales, les hypothèses sous-jacentes associées à ces modèles et les données utilisées pour vérifier l'ajustement du modèle dose-réponse sont importants. A ce jour, aucun consensus n'est envisageable sur le fait que tel modèle mathématique serait mieux adapté qu'un autre à l'établissement de la relation dose-réponse chez les STEC et en particulier pour *E. coli* O157:H7.

Dans ce contexte d'appréciation des effets, la transparence des résultats obtenus est primordiale pour apprécier les limites liées à l'établissement de la relation dose-réponse. Les hypothèses non documentées ou provenant d'avis d'experts peuvent conduire à des résultats biaisés et/ou non transparents (Dufour *et al.*, 2002; Schlundt, 2000).

En ce qui concerne les hypothèses biologiques, celles-ci doivent être simples mais refléter le mieux possible la réalité. Ainsi, si l'infection se caractérise par la présence d'un nombre élevé de pathogènes dans le tractus intestinal, ceci ne signifie pas forcément l'existence de symptômes. En parallèle de ce phénomène, il faut également penser que l'hôte développe ses propres défenses, pouvant modifier l'impact du pathogène. Cela peut refléter différents modes d'interactions entre le pathogène et l'hôte (Teunis *et al.*, 1999). Certains auteurs rappellent également que les modèles pour lesquels l'infection résulte de l'ingestion d'une seule cellule (exponentiels et Bêta-Poisson, par exemple), ont joué un rôle important dans le contexte de l'établissement de la relation dose-réponse. Ces modèles et, en particulier le modèle Bêta-Poisson, sont utilisés pour l'extrapolation aux faibles doses. Malheureusement, dans la littérature, le modèle Bêta-Poisson résulte souvent d'approximations dont la validité n'est pas totalement bien définie. Il peut en résulter des conclusions incorrectes dans la partie des faibles doses lorsque peu de données sont disponibles (Teunis and Havelaar, 2000).

Par ailleurs, les relations dose-réponse actuellement utilisées sont difficilement extrapolables et s'adaptent mal à de nouvelles conditions ou à l'étude de facteurs supplémentaires. Ainsi, les essais de contaminations sur des volontaires humains ne peuvent être réalisés pour des agents pathogènes hautement infectieux. Les volontaires sont des adultes en bonne santé et donc non représentatifs de la population générale. Le pathogène ingéré est généralement préparé à partir de cultures bactériennes préparées en laboratoire, possédant des caractéristiques différentes de celles retrouvées lors de l'ingestion de l'aliment. Une alternative aux expérimentations sur volontaires humains consiste à utiliser des modèles animaux. Cependant la variabilité existante dans le cadre de l'interaction hôte/pathogène rend souvent difficile la transposition des résultats de l'animal à l'humain. De plus, dans le cas des expérimentations sur animaux, il y a généralement peu de sujets par dose testée et les doses sont souvent très importantes pour assurer un bon niveau d'infection ou de morbidité (Buchanan *et al.*, 2000; Holcomb *et al.*, 1999). Enfin, les modalités d'étude du pathogène ou de sa toxine peuvent également se révéler importantes. Ainsi, l'activité de 2 Shiga-toxines purifiées (Stx1 et 2) est différente selon qu'elle est étudiée après injection par voie intra-péritonéale ou sur cellules Vero. Les 2 toxines purifiées sont également toxiques sur la souris mais, la toxine Stx1 est approximativement 1000 fois moins active que la toxine Stx2 sur les cellules Vero (Lindgren *et al.*, 1994).

Selon certains auteurs (Buchanan *et al.*, 2000), il est maintenant nécessaire de développer des modèles mathématiques qui seront à même de mieux prendre en compte les facteurs qui influencent la fréquence et la sévérité des infections dans la population. Par exemple, ces facteurs peuvent concerner l'influence de la barrière gastrique sur la survie du pathogène, la capacité à coloniser l'épithélium intestinal et la capacité de passer de l'infection à la maladie.

2 Limites liées à la qualité des données épidémiologiques recueillies pour valider les relations dose-réponse

Les divers modèles mathématiques nécessitent d'être validés à partir de données provenant d'épidémies mieux documentées. Certains auteurs regrettent, par exemple, que peu d'informations utiles à l'établissement de la relation dose-réponse ne soient collectées lors de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives ou des épidémies. De cette manière, des facteurs relatifs au pathogène, à l'hôte et à l'aliment pourraient mieux être pris en compte. Il devient donc important de modifier les protocoles d'enquêtes épidémiologiques afin de recueillir ce type d'information complémentaire de celle actuellement collectée (Leclerc, 2000; Sanaa and Cerf, 2002). Par exemple, la détermination du nombre de malades infectés et de non malades, la quantité d'aliment ingérée (Buchanan *et al.*, 2000; Nauta *et al.*, 2001) et l'impact éventuel de l'historique temps-température pour les aliments servis au repas et les aliments analysés (Leclerc, 2002) se révèlent intéressants à prendre en compte.

Il est également nécessaire de garder à l'esprit que les données provenant d'investigations épidémiologiques ne sont pas toujours l'exacte représentation de la réalité et qu'une sous-estimation du nombre de cas peut être à l'origine d'un biais important lors de la validation de la relation dose-réponse (Desenclos *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2000). Enfin, lors du recueil des données épidémiologiques, la définition des cas infectés et malades prend également une grande importance pour l'établissement de la relation dose-réponse. En effet, si la définition du cas infecté pose quelques difficultés (excrétion liée à un simple transit ou à une colonisation des muqueuses), la définition du cas malade est encore plus complexe (type de symptômes et sévérité très variables). Les définitions choisies peuvent donc être à l'origine d'un biais de classement. Glynn *et al.* (1995), travaillant sur *Salmonella sp.*, ont ainsi pu montrer qu'aucune association n'était établie entre la dose et la sévérité lorsque la définition des cas malades était stricte ; par contre, lorsque la définition était plus souple, des associations étaient retrouvées.

3 Limites liées à la qualité des données microbiologiques recueillies pour valider les relations dose-réponse

L'établissement de la relation dose-réponse nécessite de déterminer le nombre de pathogènes ingéré par le malade. Dans ce contexte, la valeur de dénombrement obtenue peut être de plus ou moins bonne qualité et entachée d'incertitude.

Ainsi, dans le cas d'un aliment consommé, l'échantillon servant à réaliser le dénombrement est plus ou moins représentatif de la réalité (reste de l'aliment ingéré, plat témoin, échantillon issu du même lot voire d'un lot différent analysé plusieurs semaines après l'infection).

Le type et l'intensité du stress subi par l'agent pathogène sont responsables d'une perte de cultivabilité ou de détectabilité lors de l'utilisation de milieux de culture sélectifs (Ansay *et al.*, 1999; Blackburn and McCarthy, 2000; Hara-Kudo *et al.*, 2000a; Hara-Kudo *et al.*, 2000b; McCarthy *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000) (voir Section F-Question n°26-Point 4.2). Le stress subit peut alors être à l'origine d'une sous-estimation du nombre de pathogènes réellement présents dans l'échantillon ou d'un résultat faussement négatif (méthode du nombre le plus probable). Reinders *et al.* (2002) ont étudié l'impact de diverses géloses pour des *E. coli* O157:H7 ayant subi un stress salin ou acide, ainsi que l'impact de divers facteurs sur la variance du résultat lié au dénombrement (homogénéisation de l'échantillon, réalisation de dilutions décimales).

L'identification des *E. coli* O157 sur la base de l'absence de fermentation du sorbitol présente également un risque de sous-estimation de la dose minimale infectante. L'émergence de variants phénotypiques a été rapportée par plusieurs auteurs (Allison, 2002; Bettleheim *et al.*, 2002; Bouvet *et al.*, 1999; Feng, 1995; Karch *et al.*, 1993) et peut nécessiter de baser le choix des colonies à identifier sur d'autres caractéristiques que l'absence de fermentation du sorbitol.

Les profils temps-température qui permettent une multiplication ou une perte de cultivabilité des pathogènes sont généralement mal appréciés (transformation, stockage) et donc peu pris en compte lors de l'étape de dénombrement. Pour un échantillon d'environnement (eau, terre, etc...) les connaissances sont très disparates et les facteurs influents encore moins facilement pris en compte.

La méthode de dénombrement utilisée joue également un rôle déterminant dans la qualité du résultat. En effet, les travaux de numération, déjà réalisés dans des conditions non optimales, laissent penser que les doses minimales infectantes sont plutôt faibles. Si l'on accepte cette hypothèse, les méthodes utilisées doivent donc être sensibles (quantité d'échantillon réellement analysée, prise en compte de l'efficacité de l'étape de mise en suspension des pathogènes liés à la matrice, prise en compte de la perte de cultivabilité liée au stress, de l'efficacité de l'étape d'extraction des pathogènes, de la quantité d'échantillon) et précises (limiter l'incertitude liée aux extrapolations, augmenter le nombre de dilutions ou de géloses sélectives utilisées) (Leclerc, 2000).

Dans ce contexte, la méthode la plus couramment utilisée dans le cadre de l'établissement de la relation dose-réponse est celle du nombre le plus probable (NPP). Elle consiste à réaliser des dilutions successives de la suspension mère et à réaliser un enrichissement sélectif de chacune des dilutions. La présence ou l'absence du pathogène après enrichissement est ensuite codée et permet d'obtenir un nombre le plus probable. Cette méthode est basée sur l'hypothèse - pas toujours réaliste - qu'une seule cellule (quel que soit son état physiologique) est capable de se multiplier puis d'être détectée lorsqu'elle est placée dans un bouillon d'enrichissement sélectif (pas nécessairement adapté à la cible spécifique du stress). Si l'on accepte cette hypothèse, cette méthode présente l'avantage d'obtenir un seuil de détection faible. La représentativité du résultat peut être améliorée et son incertitude réduite en augmentant la quantité d'aliment réellement testée, le nombre de dilutions et surtout le nombre de tubes par dilution. Ce NPP est bien sûr associé à un intervalle de confiance, rarement cité et pris en compte dans la construction de la relation dose-réponse, qui présente l'inconvénient d'être très large quand le nombre de tubes par dilution est faible.

D'autres méthodes mettent en œuvre un étalement de la suspension mère sur une ou plusieurs géloses sélectives et/ou chromogènes. Ces méthodes, pour être sensibles, doivent prendre en compte une concentration préalable des pathogènes avant isolement et prévoir également une étape de revivification adaptée au type de stress subi par le pathogène recherché (Leclerc, 2002). Cette concentration peut être réalisée en utilisant une étape de centrifugation qui présente de nombreux avantages (prise en compte d'une grande quantité d'échantillon, adaptabilité de la méthode à de nombreuses matrices, adaptabilité aux forts et faibles taux de contaminations à partir du même échantillon, surface de culture importante permettant de limiter les phénomènes de compétition bactérienne). Une étape de filtration, plus adaptée à l'eau, peut également être utilisée. Pour les matrices alimentaires, cette méthode pose de gros problèmes de filtrabilité. En effet, même si celle-ci peut être légèrement améliorée grâce à l'utilisation de traitements enzymatiques ou physico-chimiques, le volume filtré reste très faible et la méthode peu sensible. De plus, dans le cas de la concentration par filtration, la méthode est matrice dépendante. Enfin, dans le cas d'essais de filtration de matrices alimentaires, les colmatages et l'existence de voies de passage préférentielles peuvent être à l'origine d'une sous-estimation du nombre de colonies (10 cellules de *E. coli* concentrées sur un point du filtre ne donneront qu'une seule colonie).

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Développer des méthodes de dénombrement fiables et sensibles adaptées à *E. coli* O157 et à d'autres sérogroupes potentiellement pathogènes pour l'homme.
- ➔ Améliorer la connaissance de la physiologie des STEC afin de mettre au point des procédures de revivification adaptées aux principales conditions de stress supportées par le pathogène.
- ➔ Caractériser et comparer les diverses méthodes de dénombrement entre elles pour mieux connaître les forces et les limites de celles-ci et éviter que des données obtenues à partir de différentes méthodes ne soient systématiquement regroupées et amalgamées.
- ➔ Améliorer la communication et la collaboration entre équipes pluridisciplinaires (épidémiologistes, médecins, microbiologistes, statisticiens, gestionnaires des risques) pour recueillir une information épidémiologique mieux adaptée à l'établissement de la relation dose-réponse.
- ➔ Compléter les protocoles d'investigation des toxi-infections alimentaires collectives et des épidémies afin de valoriser l'information actuellement recueillie (dénombrement systématique du pathogène dans l'échantillon incriminé, appréciation de la quantité d'aliment ingérée, caractérisation des facteurs de risques pour la population participant au repas contaminant, caractérisation fine de la période d'incubation, de la sévérité des symptômes et de la population infectée malade et non malade, infections préalables, etc...).
- ➔ Prendre en compte les spécificités nationales (populations, souches, caractéristiques des aliments, pratiques à risque, etc...) en réalisant des études multi-pays après validation d'un protocole d'investigation optimisé sur le plan national.
- ➔ Faire une synthèse critique des données disponibles en terme d'appréciation de l'exposition.

Section J : Réglementation, Mesures de Gestion et Action de Communication sur le risque STEC en France et en Europe

Responsable de section : V. Leclerc

Rédacteurs : V. Leclerc

Personnalités consultées : A. Barnier - F. Lequerrec – B. Lombard

POINTS A RETENIR

- Au niveau européen, excepté pour les produits laitiers, aucune directive ne concerne spécifiquement la recherche de STEC ou de *E. coli* présumés pathogènes dans les aliments, l'environnement ou chez les animaux). Cependant, une réflexion est en cours afin de mettre en place des critères microbiologiques pour certains aliments.
- En France, il n'existe pas de critère microbiologique concernant la recherche de STEC ou de *E. coli* présumés pathogènes dans les aliments. Toutefois, un projet d'arrêté pourrait être élaboré pour les laits de consommation et les produits à base de lait, ainsi que les viandes hachées et les préparations à base de viandes hachées. Ce projet d'arrêté pourrait être repris dans le cadre de la révision de l'arrêté du 21 décembre 1979 relatif « *aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale* ».
- Un décret d'application de la loi sur la collecte de données épidémiologiques dans le domaine de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale est en cours d'élaboration. Ce décret imposera aux entreprises et aux laboratoires d'analyses (tous labos) d'informer les autorités sanitaires en cas de danger pour la santé humaine (STEC O157, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, etc...).
- Dans le cadre de la prévention du risque STEC, diverses mesures générales peuvent être mises en oeuvre de la production primaire à la consommation.
- En Europe, la communication sur le risque STEC passe principalement par un rappel des règles générales d'hygiène. Cependant, quelques pays ont également tenté une communication spécifique sur les *E. coli* O157 par le biais de la télévision (Royaume-Uni) ou sur les SHU grâce à des dépliants (Royaume-Uni et France).

QUESTION N°46 : QUELLE EST LA LEGISLATION EUROPEENNE CONCERNANT LES STEC ET COMMENT EST-ELLE TRANSPOSEE EN FRANCE ?

A ce jour, la législation concernant les STEC est peu développée. Ceci est dû à 2 raisons majeures :

- d'une part, les connaissances sur cet agent pathogène sont récentes et toujours en cours d'acquisition. En effet, ce n'est que dans le début des années 80 que les symptômes pathologiques sont mis en relation avec la présence de ces pathogènes dans les aliments (voir Section B). La législation, établie sur la base des données scientifiques recueillies, suit donc également cette évolution ;
- d'autre part, le manque de méthodes d'analyse normalisées et utilisables en routine par les laboratoires représente un obstacle à la mise en place de mesures de contrôles spécifiques des STEC (tous sérogroupes confondus). A ce jour, la méthode normalisée EN ISO 16654 (1) est la référence européenne pour la recherche des *E. coli* O157 dans les aliments. Cette méthode ne concerne toutefois que le sérotype O157.

De nombreuses réflexions sont en cours, tant en France qu'au niveau Communautaire, afin de renforcer la législation existante et, ainsi, mieux garantir la sécurité des consommateurs. Ce chapitre ne prend bien sûr en compte que les éléments connus à cette date et ne présume pas du devenir de cette réglementation dans le futur.

1 Législation existante dans le cadre des aliments, de l'animal ou de l'environnement

1.1 Directives européennes

Excepté pour les produits laitiers, il n'existe pas de directives imposant la recherche de STEC ou de *E. coli* présumés pathogènes dans les aliments, les animaux ou l'environnement.

En ce qui concerne les produits laitiers, la directive 92/46/CEE (2), modifiée par la directive 94/71/CE (3), arrête les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produit à base de lait. Cette directive impose la recherche de *E. coli* présumés pathogènes lorsque le nombre de *E. coli* retrouvés (critère M) dépasse les limites de 1.10^5 ufc/g ou mL (fromages fabriqués à partir de lait cru ou de lait thermisé) et 1.10^3 ufc/g ou mL (fromages à pâte molle fabriqués à partir de lait traité thermiquement). La présence de souches de *E. coli* présumées pathogènes entraîne le retrait du marché de tous les lots incriminés. Dans ce cas, l'autorité compétente est informée des résultats trouvés, des actions sont ensuite mises en œuvre pour le retrait des lots incriminés et des procédures correctives sont mises en place dans le système de surveillance de la production.

Le laboratoire Communautaire de Référence - LCR « Lait » - (AFSSA-Ierhqa, Maisons-Alfort) a été nommé pour mettre en œuvre, d'un point de vue analytique, la directive 92/46. En accord avec le réseau des Laboratoires Nationaux de Référence - LNR « Lait » -, une interprétation pratique des exigences de la directive 92/46 a été définie. Dans ce contexte, la recherche de *E. coli* présumés pathogènes est étendue à 2 étapes :

- recherche de *E. coli* O157 : tant pour des raisons épidémiologiques, qu'analytiques (la méthode normalisée EN ISO 16654 cible ce sérotype, et peut être mise en œuvre facilement dans les laboratoires de contrôle de routine),
- confirmation par des laboratoires de référence de la pathogénicité des souches de *E. coli* O157 isolées par les laboratoires de contrôle.

Les autres directives (adoptées progressivement depuis 1964 en réponse aux besoins du marché intérieur) ne prennent pas en compte la recherche des *E. coli* présumés pathogènes. Cependant, une refonte de la législation communautaire doit être réalisée dans les années à venir et devrait permettre l'adoption d'une politique intégrée s'appliquant à toutes les denrées alimentaires de la ferme au consommateur.

Parmi les directives non spécifiques des *E. coli* présumés pathogènes, certaines peuvent également permettre la mise en place de mesures générales d'hygiène favorisant, de façon croisée, la diminution du danger STEC. C'est par exemple le cas de la directive 93/43 CEE (4), relative à l'hygiène des denrées alimentaires qui impose aux responsables des établissements de production et de mise sur le marché des denrées animales et d'origine animale de mettre en œuvre les principes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) pour la maîtrise des risques.

Enfin, une réflexion est actuellement menée par la Direction Générale Santé et Protection du Consommateur (DG SANCO) dans le but de fixer des critères microbiologiques dans les aliments (finalisation d'un Règlement communautaire prévue avant fin 2003). Dans ce contexte, la DG SANCO a saisi le Comité Scientifique des mesures Vétérinaires de Santé Publique ; une réflexion⁶ a été réalisée par un groupe de travail « VTEC » dont le mandat a porté sur les questions suivantes :

- Identifier les aliments pour lesquels les STEC représentent un risque pour la santé publique,
- Evaluer la pertinence d'établir des critères microbiologiques pour ces aliments,
- Identifier les aliments pour lesquels il serait opportun d'établir un profil de risque.

1.2 Réglementation française

L'obligation de rechercher des *E. coli* présumés pathogènes n'a pas été transposée dans l'arrêté d'application du 30 mars 1994 (5). A cette date, les gestionnaires du risque manquaient de connaissances sur la façon de définir la notion de « présumé pathogène ». Il n'existe donc pas, actuellement dans la réglementation française de critères microbiologiques concernant la recherche de STEC, de *E. coli* O157 ou de *E. coli* présumés pathogènes. Cependant, suite à la sortie de l'avis de l'AFSSA (6) sur les caractéristiques à retenir pour considérer qu'une souche de *E. coli* vérotoxique est potentiellement pathogène pour l'homme, un projet d'arrêté ministériel pourrait être élaboré (7). Il devrait concerner les critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait, ainsi que les viandes hachées et les préparations à base de viandes hachées.

La révision de l'arrêté ministériel du 21 décembre 1979 a été initiée par la DGAI en début d'année 2002. Cette révision pourrait intégrer le précédent projet et permettra la proposition de critères complémentaires.

Une réflexion est également en cours afin d'introduire un décret d'application de la loi portant sur la collecte de données épidémiologiques dans le domaine de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale. Ce décret imposera notamment aux entreprises et aux laboratoires d'analyses d'informer, sans délai, les autorités sanitaires en cas de danger pour la santé humaine. Ce décret concernera les STEC O157 mais aussi *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, etc... Les critères entraînant une information seront définis par voie d'arrêté (en cours d'élaboration, comme le décret).

Remarque : par le biais de notes de service (8, 9), la direction générale de l'alimentation a également mis en œuvre des plans de surveillance ponctuels portant sur la détection de *E. coli* O157 ou plus largement sur la présence de STEC dans certains aliments sensibles (voir Section E-Question n°24).

2 Législation existante dans le cadre de la manipulation des souches en laboratoire

Classification des agents biologiques et mesures de confinement :

La directive 2000/54/CE (10) concerne la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Ce document rassemble dans un texte unique et réorganisé la totalité des dispositions de la directive 90/679 CEE (11) qui a elle-même été amendée à 4 reprises. La directive 90/679/CEE telle que modifiée est abrogée et les références faites à cette directive abrogée s'entendent comme faites à la directive 2000/54/CE.

En ce qui concerne le droit français, cette nouvelle codification (directive 2000/54/CE) ne change rien à la directive initiale (90/679/CEE) qui avait été transposée par le décret du 4 mai 1994 sur la protection des travailleurs (12) et par deux arrêtés d'application concernant la classification des agents biologiques pathogènes (13) et les mesures techniques de prévention, notamment de confinement (14).

⁶ Opinion of the Scientific Committee Veterinary Measures relating to public Health on « Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs » - European Commission - Health and Consumer Protection Directorate General – adopted on 21-22 January 2003

Dans l'arrêté du 30 juin 1998, les souches de *E. coli* cytotoxiques, sont classées en niveau de confinement ou niveau de sécurité biologique 3 (agent biologique pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme / danger sérieux pour les travailleurs / propagation possible dans la collectivité / prophylaxie ou traitements efficaces existants) impliquant des exigences importantes en terme d'aménagement de laboratoire. Toutefois, la note 8 de l'annexe III de la directive 2000/54/CE indique que ces souches de *E. coli* cytotoxiques présentent un risque d'infection limité puisqu'ils ne sont normalement pas infectieux par l'air.

Ainsi, dans le but de déterminer si, dans des conditions particulières il peut être renoncé à certaines de ces mesures, les Etats-membres doivent évaluer les mesures de confinement à appliquer à ces agents biologiques compte-tenu de la nature des activités spécifiques en question et de la quantité de l'agent biologique concerné. Sous cette condition d'avoir identifié, évalué les risques associés à cet agent biologique et mis en place des mesures de prévention adaptées, les Etats-membres ont donc la possibilité d'assouplir certaines mesures applicables au niveau de confinement 3 pour la recherche des *E. coli* vérotoxiques. Ce niveau est appelé 3* (arrêté du 30 juin 1998) ou 3** (directive 2000/54/CE).

Pour le contrôle officiel des produits laitiers au niveau européen - directive 92/46 - le LCR « Lait », en accord avec le réseau des LNR « Lait », a considéré qu'il n'était pas justifié ni faisable d'exiger la recherche des *E. coli* O157 dans un niveau de confinement 3.

QUESTION N°47 : QUELLES SONT LES MESURES DE GESTION OU LES ACTIONS DE COMMUNICATION DEJA MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE LA PREVENTION DU RISQUE RELATIF AUX STEC ?

1 Exemples de mesures de gestion du risque appliquées en Europe

Il existe, au niveau européen, un groupe de travail intitulé « Emerging pathogens » dépendant du Food Law Enforcement Practitioners (FLEP) dans lequel plusieurs pays membres (dont la France) s'investissent depuis 5 ans afin de mettre en commun leur expérience. Dans un premier temps, la réflexion concernait les méthodes de détection des *E. coli* O157 dans les aliments et l'environnement (existant et besoin dans le futur) et les résultats obtenus dans le cadre de la récolte d'informations (plans de surveillance, études spécifiques, épidémies...). Dans un deuxième temps, ce groupe de travail a initié une réflexion concernant les mesures de gestion et de communication pouvant être mises en oeuvre pour limiter la contamination et le risque *E. coli* pathogènes pour le consommateur. Les mesures de gestion et les actions de communications citées par la suite (à titre d'exemple et donc de façon non exhaustive) sont issues de la réflexion des membres du groupe de travail du FLEP et peuvent, bien sûr, avoir également été évoquées par d'autres structures (voir, par exemple, le résultat de l'enquête réalisée par la Commission Européenne en 2001).

Les mesures de gestion évoquées concernent l'ensemble de la chaîne alimentaire et varient en fonction de la sensibilité et des spécificités des pays (nombre de cas, législation, pratiques agricoles, etc.). Ces mesures n'ont pas de base législative qui soit spécifique des STEC. Toutefois, elles peuvent être utilisées dans un cadre plus général, à différents niveaux, et ainsi avoir un impact positif en terme de diminution du risque associé aux STEC. Quelques-unes de ces mesures sont citées ci-après :

- A la ferme, et plus particulièrement dans le cadre de visites de fermes, des mesures générales d'hygiène sont proposées (lavage des mains, par exemple). De plus, de nombreux pays encadrent les pratiques d'épandage de déjections animales (cultures non destinées à la consommation humaine, épandage à certaines périodes de l'année, après traitement, etc...).
- Lors du transport de l'animal à l'abattoir des mesures limitant les contaminations croisées peuvent être mises en place (camion à un seul étage, nettoyage des surfaces à chaque transport, limitation de la quantité d'aliments distribuée aux animaux avant le voyage, limitation du nombre d'arrêts afin de réduire le stress des animaux, etc.).

- A l'abattoir, l'animal ne doit pas arriver sale. Dans l'abattoir, diverses mesures spécifiques doivent également être prises : désinfection des couteaux, règles d'éviscération, élimination des animaux sales avant abattage, etc.. Il semble que les principaux problèmes rencontrés à ce stade soient des problèmes de productivité (abattoirs de qualité nécessitant d'être fermés pour des raisons de non-compétitivité) et de communication afin de faire appliquer des mesures d'hygiène décidées.
- Au stade de la transformation et de la distribution, bien que la formation et l'éducation du personnel manipulant les denrées alimentaires soit fondamentale, elle semble insuffisante pour de nombreux pays. Dans ce contexte, il existe des guides de bonnes pratiques d'hygiène. Plusieurs pays mettent également en place d'autres mesures de gestion du risque STEC (formations, licence pour ouvrir un magasin, manipulateurs d'aliments soumis à un test sur les fèces, interdiction de travailler ou de visiter des écoles ou des crèches en cas d'infection suspectée ou avérée, etc.).

Par ailleurs, la Commission Européenne (Direction Générale Santé et Protection des Consommateurs) a réalisé une enquête en 2001. Celle-ci a été menée sous la forme d'une série de missions dans le secteur de l'agro-alimentaire, portant plus précisément sur les secteurs de la viande, du lait et des produits laitiers. L'objectif de cette étude était, d'une part, de fournir un état des lieux en ce qui concerne l'importance des STEC au niveau européen et d'autre part, d'identifier, parmi toutes les mesures de gestion des risques mises en place, celles qui semblaient les plus adaptées. Six pays ont été visités (Allemagne, Belgique, Danemark, France, Portugal, Suède) et le Royaume-Uni a envoyé ses commentaires (impossibilité d'accès suite aux épisodes de fièvre aphteuse). Un projet de rapport est disponible sur Internet⁷ (SANCO/4320/2001).

Remarque : Dans le cadre des activités internationales (34^{ème} session du Codex Alimentarius, Comité Hygiène, Oct. 2001, Thaïlande), il a été proposé que soit réalisé un profil de risque concernant les *E. coli* entérohémorragiques. Ce document (15) sera présenté lors de la 35^{ème} session et devrait permettre d'identifier le danger EHEC dans les pousses de végétaux, le bœuf et le porc. Il devrait déboucher, dans les années à venir, sur une évaluation du risque correspondante aux couples pathogène / matrices étudiées. Ces informations pourront ensuite être utilisées dans le cadre de la mise en place de mesures spécifiques de gestion des risques et apporter une information utile dans le cadre de la sécurité du consommateur (législation).

2 Exemples d'actions de communication sur le risque appliquées en Europe

L'éducation du consommateur est un maillon important dans le cadre de la prévention. La communication sur le risque relatif aux *E. coli* pathogènes a donc été tentée par quelques pays participant au groupe de travail du FLEP (en particulier le Royaume-Uni). Des campagnes d'information ont été lancées. Les supports sont la télévision, la radio et la distribution de brochures. L'information diffusée par la plupart des pays participant au groupe de travail du FLEP concerne généralement des mesures d'hygiène générales (lavage des mains, contact cru/cuit, rangement et température des réfrigérateurs, conditions de cuisson, etc.) et les visites de fermes. Ces mesures ne sont pas spécifiques des STEC et concernent, en général, un grand nombre de dangers microbiens au sein des aliments. Les actions suivantes, plus spécifiques, ont également été réalisées :

- En France, un document d'1 page (format A4, recto-verso) a été élaboré dans le cadre d'une étude complémentaire sur les facteurs de risque de survenue des SHU chez l'enfant de moins de 15 ans en France (voir Section D-Question n°9). Cette plaquette d'information, distribuée aux éleveurs volontaires participant à l'étude, présente la maladie (SHU), les voies de contamination des STEC, les objectifs et le déroulement de l'étude et des mesures d'hygiène permettant de limiter les risques de transmission des STEC à l'homme.

⁷ Le projet de rapport est disponible sur Internet :

http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/special_reports/sr_rep_4320-2001_en.pdf

- Le Royaume-Uni, pour qui les STEC représente un problème de santé publique important, a également réalisé un prospectus (format A3 en recto verso) concernant spécifiquement les *E. coli* O157. Ce document intitulé « H.U.S.H. - Haemolytic Uraemic Syndrome Help », avait pour but d'être diffusé au grand public. Dans ce contexte et en cas de besoin d'informations complémentaires, un numéro de téléphone était également disponible. Plusieurs partenaires ont participé à la réalisation de cette plaquette (familles affectées, microbiologistes, médecins et spécialistes de la santé publique). En ce qui concerne l'impact de cette plaquette H.U.S.H., il semble que la distribution de ce dépliant aux consommateurs ne soit que partiellement efficace. En effet, beaucoup d'entre eux reconnaissent avoir entendu parler des *E. coli* O157 mais peu se souviennent des mesures à mettre en œuvre pour prévenir ce danger. Il est donc important que le consommateur soit informé mais surtout, il est nécessaire qu'il prenne conscience du rôle qu'il doit jouer dans la chaîne des mesures qui peuvent être prises pour garantir sa sécurité alimentaire.
- Au Royaume-Uni, une cassette vidéo est également disponible pour les personnes qui manipulent des aliments, « *E. Coli* O157, The facts ». Cette cassette a pour objectif de les sensibiliser au danger potentiellement représenté par les *E. coli* O157.
- La télévision semble également un moyen efficace de toucher de nombreuses personnes. Toutefois, son coût reste très élevé et limite donc son utilisation.
- La communication par le biais d'Internet est également très utilisée. Elle permet de fournir aux consommateurs une information spécifique des STEC (fiches pathogènes récapitulatives) et de nombreuses agences ayant en charge la sécurité des aliments ou la surveillance de la santé publique ont mis en ligne cette information⁸. Ces données présentent l'avantage d'être facilement consultables et compréhensibles par des non spécialistes. Certains instituts disposent également d'informations complémentaires diffusées sous une forme papier ou électronique : bulletin épidémiologique hebdomadaire ou annuel, revue intitulé « Surveillance nationale des maladies infectieuses » de l'Institut de Veille Sanitaire (Leclerc *et al.*, 2003), bulletin épidémiologique AFSSA-DGAI (Leclerc *et al.*, 2002), par exemple.

AXES DE REFLEXION ET DE RECHERCHE

- ➔ Définition de critères microbiologiques pour la recherche de *E. coli* O157 producteurs de Shiga-toxines dans les aliments (ou de STEC quand les méthodes seront utilisables en routine).
- ➔ Développement de systèmes d'information et de formation des services vétérinaires, des crèches, des écoles, des exploitations agricoles et des industriels.
- ➔ Préparation d'un plan de communication vers le grand public en cas de survenue d'une épidémie.

⁸ Informations générales sur *E. coli* O157 :H7 sur le site du CDC (USA):

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm

Informations générales sur VTEV *E. coli* O157 sur le site du PHLS (GB) :

http://www.phls.co.uk/topics_az/ecoli/ecoli_facts.htm

Information générale sur le site de l'OMS : <http://www.who.int/fsf/ecolifact.html>

Point sur *E. coli* O157 :H7 par (Ecole vétérinaire de Lyon) : <http://www.vet-lyon.fr/journal%20interne/archive/securite/coli.htm>

Textes réglementaires listés dans cette section :

- (1) Norme EN ISO 16654. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157. Juillet 2001.
- (2) Directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait. J.O. des Communautés européennes du 14 septembre 1992.
- (3) Directive 94/71/CE du Conseil du 13 décembre 1994 modifiant la directive 92/46/CEE arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait. J.O. des Communautés européennes du 31 décembre 1994.
- (4) Directive 93/43 /CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires
- (5) Arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché
- (6) Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments sur les caractéristiques à retenir pour considérer qu'une souche de *Escherichia coli* vérocytotoxique est potentiellement pathogène pour l'homme. Saisine n° 2001-SA-0184 du 28 novembre 2001.
- (7) Projet d'arrêté modifiant les arrêtés du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché et du 29 février 1996 fixant les conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des viandes hachées et des préparations de viandes hachées.
- (8) Note de service DGAL/SDHA/N.97/N°8168 du 24 octobre 1997 intitulée « Plan de surveillance *Escherichia coli* 0157 »
- (9) Note de service DGAL/SDHA/N2000-8102 du 09 août 2000 intitulée « Plan de surveillance de la contamination microbiologique des fromages au lait cru.
- (10) Directive 2000/54/CE du Parlement Européen et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. J.O. des Communautés européennes du 17 octobre 2000.
- (11) Directive du conseil n°90/679/CEE du 26 novembre 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail
- (12) Décret n°94-352 du 04 mai 1994 sur la protection des travailleurs contre les risques résultants de leur exposition à des agents biologiques.
- (13) Arrêté du 30 juin 1998 modifiant l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié fixant la liste des agents biologiques pathogènes. J.O. du 22 juillet 1998.
- (14) Arrêté du 13 août 1996 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. J.O. du 7 septembre 1996.
- (15) Document Codex CX/FH 03/5 Add. 4, September 2002. Risk profile for enterohemorrhagic *E. coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and pork.

Bibliographie

- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., and Ammar, M.S. (1993a) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1999-2006.
- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., and Ammar, M.S. (1993b) 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.
- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A., and Sasakawa, C. (2002) Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 3500-3509.
- Acheson, D.W., Moore, R., De Breucker, S., Lincicome, L., Jacewicz, M., Skutelsky, E., and Keusch, G.T. (1996) Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* **64**: 3294-3300.
- Acheson, D.W., Reidl, J., Zhang, X., Keusch, G.T., Mekalanos, J.J., and Waldor, M.K. (1998) In vivo transduction with shiga toxin 1-encoding phage. *Infect Immun* **66**: 4496-4498.
- Acheson, D.W., Ngo, T., and Chitrakar (2000) Prevalence of O157 and non-O157 STEC in the United States. In *4th international Symposium on 'Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections'* Kyoto, Japan.
- Ackermann, H.W., and Dubow, M.S. (1987) Viruses of Prokariotes. In *Vol II-Natural groups of bacteriophages*. Boca Raton: CPC Press, pp. 96.
- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M., and Slutsker, L. (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.
- ACMSF (1995) Report on verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. London: HMSO.
- Agin, T.S., and Wolf, M.K. (1997) Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect Immun* **65**: 320-326.
- Akashi, S., Joh, K., Tsuji, A., Ito, H., Hoshi, H., Hayakawa, T., Ihara, J., Abe, T., Hatori, M., Mori, T., and et al. (1994) A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Eur J Pediatr* **153**: 650-655.
- Alavi, S.H., Puri, V.M., Knabel, S.J., Mohtar, R.H., and Whiting, R.C. (1999) Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *J Food Prot* **62**: 170-176.
- 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**: R4-6.
- Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W., and Karch, H. (2001) *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill* **6**: 147-151.
- Allison (2002) Sorbitol-fermenting verotoxigenic *E. coli*. *SCIEH weekly report* **43**: 281.
- Allison, L.J., Carter, P.E., and Thomson-Carter, F.M. (2000) Characterization of a recurrent clonal type of *Escherichia coli* O157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland. *J Clin Microbiol* **38**: 1632-1635.
- Alpas, H., Kalchayandand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., and Ray, B. (1994) Hydrostatic pressure among strains of bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4248-4251.
- Ammon, A. (1997) Surveillance of Enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC) infections and haemolytique uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance* **2**: 91-96.
- Andral, B., Decomble, C., Ducotterd, B., Lazizzera, C., Perelle, S., and Pichoire, M. (1999a) Contamination des filières bovines par *Escherichia coli* O157:H7: résultats d'une pré-étude en abattoir. *Le point Vétérinaire* **30**: 565-567.

- Andral, B., Perelle, S., Fach, P., and Pichoire, M. (1999b) Characteristics of 32 strains of *E.coli* O157 isolated from cattle slaughtering. In *Mondial Vétérinaire de Lyon (Poster)* Lyon, France, pp. C169.
- Andral, B., Perelle, S., Decomble, C., Ducotterd, B., Lazizzera, C., Pichoire, M., and Fach, P. (2000) Détection en abattoir du portage de *E.coli* O157:H7 par les bovins et de la contamination du matériel du matériel ; caractérisation des souches pathogènes. In *Colloque de la Société Française de Microbiologie (Poster)* Paris, France.
- Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L., and Obrig, T.G. (2002) Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* **17**: 293-298.
- Anonyme (1999a) Principes et Directives régissant la conduite de l'évaluation des risques microbiologiques. In *Codex Alimentarius - CAC/GL 30 - 1999*, pp. 1-7.
- Anonyme (1999b) VTEC O157 outbreak linked to beach holidays. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **9**: 327-330.
- Anonyme (2000) Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario (may-june 2000). *Can Commun Dis Rep* **26**: 170-173.
- Anonyme (2001) Task force on *E.coli* O157 - Final report. Available on : <http://www.scotland.gov.uk/deleted//library3/health/ecoli.pdf>.
- Anonyme (2002a) Report on trends and sources of zoonotic agents in animals, feedstuffs, food and man the European Union and Norway 2000. In *European commission SANCO/927/2002. Community Reference laboratory on the Epidemiology of zoonoses: BgVV - Berlin, Germany*.
- Anonyme (2002b) Terminologie en analyse de risque. *Epidémiologie et santé animale* **41**: 1-3.
- Ansary, S.E., and Kaspar, C.W. (1997) Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* **25**: 131-134.
- Ansary, S.E., Darling, K.A., and Kaspar, C.W. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2 degrees C, and -20 degrees C. *J Food Prot* **62**: 1243-1247.
- Arana, I., Justo, J.I., Muela, A., and Barcina, I. (2001) Survival and plasmid transfer ability of *Escherichia coli* in wastewater. *Water, Air and Soil Poll* **126**: 223-238.
- Armstrong, G.D., and Rowe, P. (1997) Clinical trials of Synsorb-Pk in preventing HUS. In *3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin) Producing Escherichia coli Infections - Loys Joy Galler Foundations for Hemolytic Uremic Syndrome Inc.* Melville, New York.
- Asai, Y., Murase, T., Osawa, R., Okitsu, T., Suzuki, R., Sata, S., Yamai, S., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., and Watanabe, H. (1999) [Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from processed salmon roe associated with the outbreaks in Japan, 1998, and a molecular typing of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis]. *Kansenshogaku Zasshi* **73**: 20-24.
- Asakura, H., Makino, S., Shirahata, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., Ikeda, T., and Takeshi, K. (1998) Detection and long-term existence of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* in sheep. *Microbiol Immunol* **42**: 683-688.
- Assanta, M.A., Roy, D., Lemay, M.J., and Montpetit, D. (2002) Evidence for *Escherichia coli* O157:H7 attachment to water distribution pipe materials by scanning electron microscopy. *J Food Prot* **65**: 1970-1975.
- Augustin, J.C., and Carlier, V. (2000) Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiol* **56**: 53-70.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., and Carlier, V. (2000a) Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1706-1710.
- Augustin, J.C., Rosso, L., and Carlier, V. (2000b) A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **57**: 169-181.
- Bach, S.J., McAllister, T.A., Baah, J., Yanke, L.J., Veira, D.M., Gannon, V.P., and Holley, R.A. (2002) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. *J Appl Microbiol* **93**: 288-294.
- Bain, C., Keller, R., Collington, G.K., Trabulsi, L.R., and Knutton, S. (1998) Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 3900-3908.
- Baker, D.R., Moxley, R.A., and Francis, D.H. (1997) Variation in virulence in the gnotobiotic pig model of O157:H7 *Escherichia coli* strains of bovine and human origin. *Adv Exp Med Biol* **412**: 53-58.

- Barak, J.D., Whitehand, L.C., and Charkowski, A.O. (2002) Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4758-4763.
- Baranyi, J., and Roberts, T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* **23**: 277-294.
- Baranyi, J., and Roberts, T.A. (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* **26**: 199-218.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., and Mackey, B.M. (1995) Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int J Food Microbiol* **27**: 61-75.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T., and Roberts, T.A. (1996) Effects of parameterization on the performance of empirical models used in "predictive microbiology". *Food Microbiology* **13**: 83-91.
- Barker, J., Humphrey, T.J., and Brown, M.W. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 291-295.
- Barrett, T.J., Green, J.H., and Griffin, P.M. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies to Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and *Escherichia coli* O157:H7 lipopolysaccharide in human serum. *Curr Microbiol* **23**: 189-195.
- Barrett, T.J., Kaper, J.B., Jerse, A.E., and Wachsmuth, I.K. (1992) Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J Infect Dis* **165**: 979-980.
- 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.
- Bastian, S.N., Carle, I., and Grimont, F. (1998) Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**: 457-472.
- Beery, J.T., Doyle, M.P., and Schoeni, J.L. (1985) Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* **49**: 310-315.
- Begum, D., and Jackson, M.P. (1995) Direct detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **9**: 259-264.
- Belanger, S.D., Boissinot, M., Menard, C., Picard, F.J., and Bergeron, M.G. (2002) Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J Clin Microbiol* **40**: 1436-1440.
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., and et al. (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *Jama* **272**: 1349-1353.
- Bellin, T., Pulz, M., Matussek, A., Hempen, H.G., and Gunzer, F. (2001) Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol* **39**: 370-374.
- Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casale, K.A., and Osterholm, M.T. (1991) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J Infect Dis* **164**: 338-343.
- 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.
- 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.
- Benito, A., Ventura, G., Casadei, M., Robinson, T., and Mackey, B. (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1564-1569.
- Benjamin, M.M., and Datta, A.R. (1995) Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1669-1672.
- Berdholt, S., and Nesbakken, T. (1999) Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in cooked, vacuum and gas-packaged meat. *Int J Food Microbiol* **53**: 43-52.
- Berry, E.D., and Cutter, C.N. (2000) Effects of acid adaptation of *E. 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.
- Bertschinger, H.U., and Pohlenz, J. (1983) Bacterial colonization and morphology of the intestine in porcine *Escherichia coli* enterotoxemia (edema disease). *Vet Pathol* **20**: 99-110.
- 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.
- Besser, T.E., Hancock, D.D., Pritchett, L.C., McRae, E.M., Rice, D.H., and Tarr, P.I. (1997) Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* **175**: 726-729.
- Besser, T.E., Richards, B.L., Rice, D.H., and Hancock, D.D. (2001) *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect* **127**: 555-560.
- Bettleheim, K.A., Whipp, M., Djordjevic, S.P., and V., R. (2002) First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. *J. Med. Microbiol.* **51**: 713-714.
- Beuchat, L.R. (1997) Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seeds destined for sprout production. *Int J Food Microbiol* **34**: 329-333.
- Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B., and Clavero, M.R. (1998) Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *J Food Prot* **61**: 1305-1311.
- Beuchat, L.R. (1999) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *J Food Prot* **62**: 845-849.
- 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 Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* **267**: 576-588.
- Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., and Stephan, R. (1989) Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **27**: 2559-2564.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., and Scheutz, F. (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* **31**: 2483-2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., and Karch, H. (1995) Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J Clin Microbiol* **33**: 631-635.
- 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., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H.A., and Whittam, T.S. (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2175-2180.
- Beutin, L., Zimmermann, S., and Gleier, K. (1998) Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerg Infect Dis* **4**: 635-639.
- Beutin, L. (1999) *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* **30**: 285-298.
- 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., Zimmermann, S., and Gleier, K. (2002) Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* **42**: 1-8.
- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M.A., Khakhria, R., Janda, J., Blahova, K., and Karch, H. (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* **36**: 2135-2137.

- Bilge, S.S., Vary, J.C., Jr., Dowell, S.F., and Tarr, P.I. (1996) Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect Immun* **64**: 4795-4801.
- Bitzan, M., Moebius, E., Ludwig, K., Muller-Wiefel, D.E., Heesemann, J., and Karch, H. (1991) High incidence of serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. *J. Pediatr* **119**: 380-385.
- Bitzan, M., and Karch, H. (1992) Indirect hemagglutination assay for diagnosis of *Escherichia coli* O157 infection in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **30**: 1174-1178.
- Bitzan, M., Ludwig, K., Klemm, M., König, H., Buren, J., and Muller-Wiefel, D.E. (1993) The role of *Escherichia coli* O 157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicentre study. *Epidemiol Infect* **110**: 183-196.
- Blackburn, C.W., Curtis, L.M., Humpheson, L., Billon, C., and McClure, P.J. (1997) Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Int J Food Microbiol* **38**: 31-44.
- Blackburn, C.W., and McCarthy, J.D. (2000) Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int J Food Microbiol* **55**: 285-290.
- Blackwell, C.C., Dundas, S., James, V.S., Mackenzie, D.A., Braun, J.M., Alkout, A.M., Todd, W.T., Elton, R.A., and Weir, D.M. (2002) Blood group and susceptibility to disease caused by *Escherichia coli* O157. *J Infect Dis* **185**: 393-396.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Gonzalez, E.A., Alonso, M.P., Maas, H., and Jansen, W.H. (1996) Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol* **12**: 13-19.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Blond, A., Cheminant, M., Segalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Goulard, C., Salomon, R., Moreno, F., Farias, R., and Rebuffat, S. (2001) Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **268**: 2124-2133.
- Boerlin, P., Chen, S., Colbourne, J.K., Johnson, R., De Grandis, S., and Gyles, C. (1998) Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect Immun* **66**: 2553-2561.
- Boerlin, P. (1999) Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **56**: 735-741.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., and Gyles, C.L. (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**: 497-503.
- Bollman, J., Ismond, A., and Blank, G. (2001) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen foods: impact of the cold shock response. *Int J Food Microbiol* **64**: 127-138.
- Bolton, D.J., Byrne, C.M., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., and Blair, I.S. (1999) The survival characteristics of a non-toxicogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **86**: 407-411.
- Bolton, F.J., Chapman, P.A., Farthing, M., Mani-Saada, J., O'Brien, S.J., Painter, M.J., Salmon, R.L., Sebastian, M., Smith, H.R., Trevena, B., and Wood, M.J. (2000) Guidelines for the control of infection with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Communicable Disease and Public Health* **3**: 14-23.
- Booth, L., and Rowe, B. (1993) Possible occupational acquisition of *Escherichia coli* O157 infection. *Lancet* **342**: 1298-1299.
- Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Illeff, D., Cuvelier, B., Capek, I., Tribout, B., Bingen, E., and Piussan, C. (1997) Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **11**: 36-39.
- Bouvet, J., and Vernozy-Rozand, C. (2000) Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxiques (STEC) et de *E.coli* O157:H7 dans les aliments. *Rev Med Vet* **151**: 907-914.
- Bouvet, J., Bavai, C., Rossel, R., Le Roux, A., Montet, M.P., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Arquilliere, C., and Vernozy-Rozand, C. (2001) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* **71**: 249-255.

- Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., and Vernozy-Rozand, C. (2002a) 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.
- Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., and Vernozy-Rozand, C. (2002b) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in French pork. *J Appl Microbiol* **93**: 7-14.
- Bouvet, O.M., Pernoud, S., and Grimont, P.A. (1999) Temperature-dependent fermentation of D-sorbitol in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4245-4257.
- Bovill, R., Bew, J., Cook, N., D'Agostino, M., Wilkinson, N., and Baranyi, J. (2000) Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *Int J Food Microbiol* **59**: 157-165.
- Bovill, R.A., Bew, J., and Baranyi, J. (2001) Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature II. Rapidly changing temperatures. *Int J Food Microbiol* **67**: 131-137.
- Brackett, R.E. (1992) Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *J Food Prot* **55**: 808-814.
- Breand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., and Tomassone, R. (1999) A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **46**: 251-261.
- Brenner, D.J., Fanning, G.R., Skerman, F.J., and Falkow, S. (1972) Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J Bacteriol* **109**: 933-965.
- Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L., and Griffin, P.M. (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.
- Brooks, H.J., Mollison, B.D., Bettelheim, K.A., Matejka, K., Paterson, K.A., and Ward, V.K. (2001) Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Lett Appl Microbiol* **32**: 118-122.
- 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, pp. 22-43.
- Brown, M.R., Smith, A.W., Barker, J., Humphrey, T.J., and Dixon, B. (2002) *E. coli* O157 persistence in the environment. *Microbiology* **148**: 1-2.
- 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.
- Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., and Karch, H. (1999) The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1005-1014.
- Buchanan, R.L. (1991) Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *J. Food. Safety* **11**: 123-134.
- Buchanan, R.L., and Klawitter, L.A. (1992) The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology* **9**: 185-196.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., R.V., G., and Phillips, J.G. (1993) Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* **10**: 303-315.
- Buchanan, R.L., and Bagi, L.K. (1994) Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int J Food Microbiol* **23**: 317-332.

- Buchanan, R.L., and Edelson, S.G. (1996) Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4009-4013.
- 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.
- Buchanan, R.L., Smith, J.L., and Long, W. (2000) Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *Int J Food Microbiol* **58**: 159-172.
- Buchko, S.J., Holley, R.A., Olson, W.O., Gannon, V.P., and Veira, D.M. (2000) The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *J Food Prot* **63**: 1467-1474.
- Bulte, M., Herckotter, S., and Schwenck, P. (1996) Enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC) aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? *Fleischwirtschaft* **76**: 88-91.
- 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.
- Burnens, A.P., Zbinden, R., Kaempf, L., Heinzer, I., and Nicolet, J. (1993) A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Zentralbl Bakteriol* **279**: 512-517.
- Burnett, S.L., Chen, J., and Beuchat, L.R. (2000) Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4679-4687.
- Buswell, C.M., Nicholl, H.S., and Walker, J.T. (2001) Use of continuous culture bioreactors for the study of pathogens such as *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 in biofilms. *Methods Enzymol* **337**: 70-78.
- Byrne, C.M., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Blair, I.S., and McDowell, D.A. (2002) The effect of commercial production and product formulation stresses on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900) in beef burgers. *Int J Food Microbiol* **79**: 183-192.
- Byun, M.W., Kwon, O.J., Yook, H.S., and Kim, K.S. (1998) Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in culture media. *J Food Prot* **61**: 728-730.
- Calderwood, S.B., and Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J Bacteriol* **169**: 4759-4764.
- 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., Kaspar, C.W., Buege, D.R., and Luchansky, J.B. (2002) Effectiveness of spraying with tween 20 and lactic acid in decontaminating inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous *Escherichia coli* biotype I on beef. *J Food Prot* **65**: 26-32.
- Caprioli, A., Nigrelli, A., Gatti, R., Zavanella, M., Blando, A.M., Minelli, F., and Donelli, G. (1993) Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec* **133**: 323-324.
- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., Farina, C., Goglio, A., Gianviti, A., and Rizzoni, G. (1994) Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **169**: 208-211.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* **75**: 499-511.
- Carter, A.O., Borczyk, A.A., Carlson, J.A., Harvey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A., Krishnan, C., Korn, D.A., and Lior, H. (1987) A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7--associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* **317**: 1496-1500.
- Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoit, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P., and Grimont, P. (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. *Int J Food Microbiol* **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.

- Cassin, M.H., Lammerding, A.M., Todd, E.C., Ross, W., and McColl, R.S. (1998) Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int J Food Microbiol* **41**: 21-44.
- Castillo, A., Lucia, L.M., Kemp, G.K., and Acuff, G.R. (1999) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chlorite. *J Food Prot* **62**: 580-584.
- Castillo, A., Lucia, L.M., Roberson, D.B., Stevenson, T.H., Mercado, I., and Acuff, G.R. (2001) Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. *J Food Prot* **64**: 58-62.
- Cavallito, C.J., H., B.J., S., B.J., and Suter, C.M. (1944) Allicin, the antimicrobial principle of *Allium sativum*. II. Determination of chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **66**: 1952-1954.
- Cave, H., Mariani-Kurkdjian, P., and Granchamp, B. (1994) Reliability of PCR directly from stool samples : usefulness of an internal control. *Bio Techniques* **16**: 809-810.
- CDC (1991) Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7--North Dakota, 1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **40**: 265-267.
- CDC (1993) Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers--western United States, 1992-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **42**: 258-263.
- CDC (1995) Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21--Helena, Montana, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **44**: 501-503.
- 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, 1997. *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, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **48**: 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 (2001) Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Among Children Associated With Farms Visits - Pennsylvania and Washington 2000. *MMWR Morbidity Mortality Weekly Report* **50**: 293-297.
- 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.
- CDSC (1998) Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurised cream. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **8**: 377.
- CDSC (1999) *Escherichia coli* O157 associated with eating unpasteurised cheese--update. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **9**: 131, 134.
- CDSC (2000a) Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurized milk. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **10**: 203, 206.
- CDSC (2000b) Outbreak of VTEC O157 in South Yorkshire. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **10**: 359.
- 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.
- 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.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, D.J., Norman, P., Fox, J., and Crick, E. (1993a) Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect* **111**: 439-447.
- Chapman, P.A., Wright, D.J., and Higgins, R. (1993b) Untreated milk as a source of verotoxigenic *E coli* O157. *Vet Rec* **133**: 171-172.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., and Harkin, M.A. (1996) Sheep as a potential source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *Vet Rec* **138**: 23-24.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Gerdan Malo, A.T., and Harkin, M.A. (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect* **119**: 245-250.

- Chapman, P.A., Cornell, J., and Green, C. (2000a) Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol Infect* **125**: 531-536.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., and Harkin, M.A. (2000b) A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect* **124**: 207-213.
- Characklis, W.G. (1989) Microbial biofouling control. In *Biofilms*. Characklis, K.C. (ed). New York: Wiley, J. and sons, pp. 585-631.
- Charkowski, A.O., Barak, J.D., Sarreal, C.Z., and Mandrell, R.E. (2002) Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3114-3120.
- Chart, H. (1993) Serodiagnosis of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 and other Verotoxin producing *Escherichia coli*. *Serodiagn Immunother Infect Disease* **1**: 8-12.
- Chart, H. (1998) Are all infections with *Escherichia coli* O157 associated with cattle? *Lancet* **352**: 1005.
- Chen, C.-I., Griebe, T., Srinivasan, R., and Stewart, P.S. (1993) Effects of various metal substrata on accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and efficacy of monochloramine as a biocide. *Biofouling* **7**: 241-251.
- Chen, J., Johnson, R., and Griffiths, M. (1998) Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 147-152.
- 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. (1996) rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1822-1824.
- China, B., Goffaux, F., Pirson, V., and Mainil, J. (1999) Comparison of eae, tir, espA and espB genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 177-182.
- Christiansen, L.N., Tompkin, R.B., and Sharparis, A.B. (1975) Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in a summer style sausage. *J. Food Sci.* **40**: 488-490.
- 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.
- Cimolai, N., Carter, J.E., Morrison, B.J., and Anderson, J.D. (1990) Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* **116**: 589-592.
- Clarke, R.C., Wilson, J.B., Read, S.C., Renwick, S., Rahn, K., Johnson, R.P., Alves, D., Karmali, M.A., Lior, H., McEwen, S.A., Spika, J., and Gyles, C.S. (1994) Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain : Preharvest and processing perspectives. In *Recent Advances in Vero-cytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Karmali, M.A. and Goglio, A.G. (eds): Elsevier Science B. V., pp. 17-24.
- Cobbold, R., and Desmarchelier, P. (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* **71**: 125-137.
- 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.
- Cockerill, F., 3rd, Beebakhee, G., Soni, R., and Sherman, P. (1996) Polysaccharide side chains are not required for attaching and effacing adhesion of *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**: 3196-3200.
- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., and Vugia, D.J. (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., Sharp, J.C., Campbell, D.M., Curnow, J., and Ramsay, C.N. (1998) Environmental risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infection in Scotland: results of a descriptive epidemiology study. *J Infect* **36**: 317-321.

- 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.
- Coimbra, R.S., Grimont, F., Lenormand, P., Burguiere, P., Beutin, L., and Grimont, P.A. (2000) Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res Microbiol* **151**: 639-654.
- Colwell, R.R., DP.R., B., D.J., G., Roszak, D.B., S.A., H., and M., O.L. (1985) Viable, bio non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* **3**: 817-820.
- Comes, J.E., and Beelman, R.B. (2002) Addition of fumaric acid and sodium benzoate as an alternative method to achieve a 5-log reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in apple cider. *J Food Prot* **65**: 476-483.
- Conedera, G., Chapman, P.A., Marangon, S., Tisato, E., Dalvit, P., and Zuin, A. (2001) A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *Int J Food Microbiol* **66**: 85-93.
- Conlan, J.W., and Perry, M.B. (1998) Susceptibility of three strains of conventional adult mice to intestinal colonization by an isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* **44**: 800-805.
- Conner, D.E. (1992) Temperature and NaCl affect growth and survival of *E.coli* O157:H7 in poultry-based and laboratory media. *J. Food Sci.* **57**: 532-533.
- Conner, D.E., and Kotrola, J.S. (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol* **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.
- Cooner, D.E., and Hall, G.S. (1994) Efficacy of selected media for recovery of *E.coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiology* **11**: 337-344.
- Coquard, D., Offinet, S., Houdaf, A., Sacherer, S., Frechon, D., and Leguerb-Fellous, M. (1998) Comparative evaluation of different standard method and a PCR method for detection of *E.coli* O157:H7 in food and water samples. Centre d'analyses et de recherche - Illkirch, France.
- Cornick, N.A., Booher, S.L., Casey, T.A., and Moon, H.W. (2000a) Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4926-4934.
- Cornick, N.A., Matisse, I., Samuel, J.E., Bosworth, B.T., and Moon, H.W. (2000b) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J Infect Dis* **181**: 242-251.
- Cornu, M., Delignette-Muller, M.L., and Flandrois, J.P. (1999) Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5322-5327.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., and Palmas, F. (1999) In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letts Appl Microbiol* **29**: 130-135.
- Couzin, J. (1998) Cattle diet linked to bacterial growth. *Science* **281**: 1578-1579.
- Cowden, J.M. (1997) Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157 November-December 1996. *Eurosurveillance* **2**: 1-2.
- Cowden, J.M., and Christie, P. (1997) Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157. *Health Bull Edinb* **55**: 9-10.
- 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.
- Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., Nauta, J., and Wolff, E.D. (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water? *Clin Nephrol* **46**: 45-49.
- Cray, W.C., Jr., and Moon, H.W. (1995) Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1586-1590.
- Crockett, C.S., Haas, C.N., Fazil, A., Rose, J.B., and Gerba, C.P. (1996) Prevalence of shigellosis in the U.S.: consistency with dose-response information. *Int J Food Microbiol* **30**: 87-99.

- Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D.M., Hunter, S.B., Hoekstra, R.M., Wong, S.K., Griffin, P.M., and Van Gilder, T.J. (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* **347**: 555-560.
- Curry, R., Unklesbay, N., Clevenger, T., Brazos, B., Mesyats, G., and Filatov, A. (1999) The effect of high doses rate X-rays on *E.coli* O157:H7 in ground beef. In *IEEE on Plasma Science*.
- Cutter, C., and Siragusa, G.R. (1995) Population reductions of Gram-negative pathogens following treatment with nisin and chelators under various conditions. *J Food Prot* **58**: 977-983.
- Dalgaard, P. (1995) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int J Food Microbiol* **26**: 305-317.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**: 3593-3596.
- Davidson, P.M., and Naidu, A.S. (2000) Phyto-phenols. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. A.S., N. (ed). London, New-York, Whashington DC: CRC Press, Boca-Raton, pp. 265-294.
- De Valk, H., and Decludt, B. (1997) Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entéro-hémorragique : enquête auprès des laboratoires de bactériologie. Réseau National de Santé Publique - Saint Maurice, France, pp. 22.
- De Zutter, L., Uradzinski, J., and Pierard, D. (1999) Prevalence of enterohemorrhagic *E.coli* O157 in Belgian slaughter cattle. In *Second International Symposium of the European Study Group on Enterohemorrhagic Escherichia coli* April 16-17 Brussels,: Acta Clinica Belgica, pp. 48.
- Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T., Cray, W.C., Jr., and Moon, H.W. (1997) Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* **65**: 1842-1848.
- Decludt, B. (1995) Cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques dans le département de l'Ardèche en 1994 - Rapport d'investigation. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France.
- Decludt, B. (1998) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en 1996. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, numéro spécial Février 1998*: 43-44.
- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B., Loirat, C., and Pédiatrique, and Société de Néphrologie Pédiatrique. (2000) Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect* **124**: 215-220.
- DeGrandis, S., Law, H., Brunton, J., Gyles, C., and Lingwood, C.A. (1989) Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* **264**: 12520-12525.
- Delaquis, P.J., Sholberg, P.L., and Stanich, K. (1999) Disinfection of mung bean seed with gaseous acetic acid. *J Food Prot* **62**: 953-957.
- Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H., Cliver, D.O., and Jothikumar, N. (1998) Removal of *Escherichia coli* O157:H7 from surface tissues of beef carcasses inoculated with wet and dry manure. *J Food Prot* **61**: 1265-1268.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., and Flandrois, J.P. (1995) Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *Int J Food Microbiol* **27**: 139-146.
- Delignette-Muller, M.L. (1998) Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *Int J Food Microbiol* **43**: 97-104.
- Deng, Y., Ryu, J.H., and Beuchat, L.R. (1999) Tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J Appl Microbiol* **86**: 203-210.
- Derval, I. (2001) The epidemiology of verocytotoxigenic *E. coli* O157:H7 in Ireland. In *Epidemiology of Verototoxigenic E.coli organised by EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y. and McDowell, D. (eds.) Malahide, Dublin, Ireland 8-10th February 2001.
- Desenclos, J.-C., Vaillant, V., and de Walk, H. (2002) Les questions de santé publique et de recherche qui se posent dans le domaine du risque alimentaire infectieux justifient-elles de nouveaux recueil de données ? *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **50**: 67-79.
- Desmarchelier, P.M., Bilge, S.S., Fegan, N., Mills, L., Vary, J.C., Jr., and Tarr, P.I. (1998) A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* **36**: 1801-1804.
- Dev, V.J., Main, M., and Gould, I. (1991) Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157. *Lancet* **337**: 1412.

- 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.
- DeVinney, R., Puente, J.L., Gauthier, A., Goosney, D., and Finlay, B.B. (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* **41**: 1445-1458.
- Dewanti, R., and Wong, A.C. (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **26**: 147-164.
- DGCCRF (2002) Statistiques annuelles des denrées traitées par ionisation - Note d'information n°2002-36-20 mars 2002. Direction Générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes.
- Diez-Gonzalez, F., Callaway, T.R., Kizoulis, M.G., and Russell, J.B. (1998) Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* **281**: 1666-1668.
- 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.
- Djordjevic, S.P., Hornitzky, M.A., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K., and Bettelheim, K.A. (2001) Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J Clin Microbiol* **39**: 2017-2021.
- Dock, L.L., Floros, J.D., and Linton, R.H. (2000) Heat inactivation of *E.coli* O157:H7 in apple cider containing malic acid, sodium benzoate, and potassium sorbate. *J Food Prot* **63**: 1026-1031.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953-3961.
- Donnenberg, M.S., Tzipori, S., McKee, M.L., O'Brien, A.D., Alroy, J., and Kaper, J.B. (1993) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**: 1418-1424.
- 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., and Schoeni, J.L. (1984) Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* **48**: 855-856.
- 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.
- Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* **12**: 289-301.
- Duffy, G., Whiting, R.C., and Sheridan, J.J. (1999) The effect of competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* **16**: 299-307.
- Dufour, B., Hattenberger, A.M., and Martin, A. (2002) Appréciation qualitative du risque et expertise collégiale. *Epidémiologie et santé animale* **41**: 45-52.
- Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., and Notermans, S. (1997) The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int J Food Microbiol* **34**: 89-94.
- Dundas, S., Todd, W.T., Stewart, A.I., Murdoch, P.S., Chaudhuri, A.K., and Hutchinson, S.J. (2001) The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* **33**: 923-931.
- Dupray, I., Caprais, M.P., Derrien, A., Monfort, P., Convent, A., Penot, J., Fach, P.D., F., Pérelle, S., Grout, J., Federighi, M., Jugiau, F., and Rama, F. (1999) Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de Fresnaye. In *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*. IFREMER (ed.) Ploufragan, Saint Brieuc - France, pp. 169-178.
- Eckert, J.W., and Ogawa, J.M. (1998) The chemical control of post harvest diseases : deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 433.
- Effler, E., Isaacson, M., Arntzen, L., Heenan, R., Canter, P., Barrett, T., Lee, L., Mambo, C., Levine, W., Zaidi, A., and Griffin, P.M. (2001) Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerg Infect Dis* **7**: 812-819.
- Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koomaraie, M., and Laegreid, W.W. (2000) Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hides and carcasses of beef during processing. *P.N.A.S* **97**: 2999-3003.

- Elliott, E.J., Robins-Browne, R.M., O'Loughlin, E.V., Bennett-Wood, V., Bourke, J., Henning, P., Hogg, G.G., Knight, J., Powell, H., and Redmond, D. (2001) Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome : clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* **85**: 125-131.
- Elliott, S.J., Yu, J., and Kaper, J.B. (1999) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* **67**: 4260-4263.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (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.
- El-Ziney, M.G. (1997) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites : the role of lactic acid, enterocin 570 and reuterine. Thèse de doctorat de 3ème cycle - Université de Ghent.
- El-Ziney, M.G., and Debevere, J.M. (1998) The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *J Food Prot* **61**: 1275-1280.
- El-Ziney, M.G., van den Tempel, T., Debevere, J., and Jakobsen, M. (1999) Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *J Food Prot* **62**: 257-261.
- El-Ziney, M.G., Debevere, J., and Jakobsen, M. (2000) Reuterin. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. S, N.A. (ed). Boca Raton, London, New-York, Washington D. C.: CRC Press, pp. 567-587.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**: 45-50.
- Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y., and Ohta, M. (1997) [Antibacterial actin of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 (Part 2). Effect of sodium chloride and temperature on bactericidal activity]. *Kansenshogaku Zasshi* **71**: 451-458.
- EPRI (1997) Expert Panel Report : Evaluation of the history and safety of ozone in processing foods for human consumption. Vol. 1-3: EPRI, CA.
- Espié, E., and Vaillant, V. (2003) Toxi-infection collective Alimentaire à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, gironde Juin 2002-rapport d'investigation. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France, pp. (en cours de rédaction).
- Espié, E., Grimont, F., Vernozy-Rozand, C., Vaillant, V., and De Valk, H. (2003) An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with mutton consumption. France, June 2002. In *5th International Symposium on 'Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections'*. Vol. soumis pour publication june 2003 - Edimburg, Scotland.
- 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., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B., and Kaspar, C.W. (1996) Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1519-1525.
- 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 CO₂. *Int J Food Microbiol* **37**: 47-54.
- Farkas, D.F., and Hoover, D.G. (2000) High pressure processing. Kinetics of Microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Journal of Food Science Supplement*: 47-64.
- Farrell, B.L., Ronner, A.B., and Wong, A.C. (1998) Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *J Food Prot* **61**: 817-822.
- FDA (1995a) Beverages : bottled water ; Final rule, Food and Drug Administration. *Fed. Reg.* **60**: 57075-57130.
- FDA (1995b) Department of Health and Human Services. Secondary Food direct additives permitted in food for human consumption. *Fed. Reg.* **60**: 11899-11900.
- FDA (1998a) Department of Health and Human Services. Secondary Food direct additives permitted in food for human consumption *Fed. Reg.* **63**: 11118-11119.

- FDA (1998b) Department of Health and Human Services. Secondary Food direct additives permitted in food for human consumption. *Fed. Reg.* **63**: 38746-38747.
- FDA (1999) Department of Health and Human Services. Secondary Food direct additives permitted in food for human consumption. *Fed. Reg.* **64**: 44122-44123.
- Fegan, N., and Desmarchelier, P. (1999) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia. *Lett Appl Microbiol* **28**: 335-339.
- Feng, P. (1993) Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for an allele of uid A gene. *Mol Cell Probes* **7**: 151-154.
- Feng, P. (1995) *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg Infect Dis* **1**: 47-52.
- 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.
- Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A., and Svoboda, I. (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 149S-156S.
- Fenlon, D.R., and Wilson, J. (2000) Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol* **30**: 118-121.
- Ferreira, A.J., Elias, W.P., Jr., Pelayo, J.S., Giraldo, R., Pedroso, M.Z., and Scaletsky, I.C. (1997) Culture supernatant of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains provoke fluid accumulation in rabbit ileal loops. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**: 285-288.
- Fett, W.F. (2000) Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J Food Prot* **63**: 625-632.
- Fett, W.F. (2002) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on laboratory-inoculated mung bean seed by chlorine treatment. *J Food Prot* **65**: 848-852.
- Fields, P.I., Blom, K., Hughes, H.J., Helsen, L.O., Feng, P., and Swaminathan, B. (1997) Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol* **35**: 1066-1070.
- Fiorito, P., Burgos, J.M., Miyakawa, M.F., Rivas, M., Chillemi, G., Berkowski, D., Zotta, E., Silberstein, C., and Ibarra, C. (2000) Effect of Shiga toxin 2 on water and ion transport in human colon in vitro. *Dig Dis Sci* **45**: 480-486.
- Fischer, J.R., Zhao, T., Doyle, M.P., Goldberg, M.R., Brown, C.A., Sewell, C.T., Kavanaugh, D.M., and Bauman, C.D. (2001) Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1218-1224.
- Flores, L.M., Summer, S.S., Petres, D.L., and Mandigo, R. (1996) Evaluation of a phosphate control pathogen growth in fresh and processed meat products. *J Food Prot* **59**: 356-359.
- Fong, J.S., de Chadarevian, J.P., and Kaplan, B.S. (1982) Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Am* **29**: 835-856.
- Fortin, N.Y., Mulchandani, A., and Chen, W. (2001) Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Biochem* **289**: 281-288.
- 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. (1995) Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit Rev Microbiol* **21**: 215-237.
- Francis, D.H., Moxley, R.A., and Andraos, C.Y. (1989) Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect Immun* **57**: 1339-1342.
- Frank, J., F., and Koffi, R.A. (1990) Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J Food Prot* **53**: 550-554.
- Frankel, G., Candy, D.C., Everest, P., and Dougan, G. (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**: 1835-1842.
- Frankel, G., Philips, A.D., Novakova, M., Batchelor, M., Hicks, S., and Dougan, G. (1998) Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol* **29**: 559-570.

- Fratamico, P.M., and Bagi, L.K. (2001) Comparison of an immunochromatographic method and the TaqMan *E. coli* O157:H7 assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprout spent irrigation water and in sprouts after blanching. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**: 129-134.
- 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.
- Friedman, M., Henika, P.R., and Mandrell, R.E. (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* **65**: 1545-1560.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., and Karch, H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**: 74-84.
- Frydendahl, K., Imberechts, H., and Lehmann, S. (2001) Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes* **15**: 151-160.
- FSAI (1999) The prevention of *E. coli* O157:H7 infection : A shared responsibility. Dublin: Food Safety of Ireland.
- Fukushima, H., Hoshina, K., and Gomyoda, M. (1999) Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5177-5181.
- Gagliardi, J.V., and Karns, J.S. (2000) Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl Environ Microbiol* **66**: 877-883.
- Gagliardi, J.V., and Karns, J.S. (2002) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* **4**: 89-96.
- Gagnadoux, M.F., Habib, R., Gubler, M.C., Bacri, J.L., and Broyer, M. (1996) Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol* **46**: 39-41.
- Gannon, V.P., Rashed, M., King, R.K., and Thomas, E.J. (1993) Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 1268-1274.
- Garber, L., Wells, S., Schroeder-Tucker, L., and Ferris, K. (1999) Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J Food Prot* **62**: 307-312.
- Garsen, J., Havelaar, A.H., Dufrenne, J.B., Koedam, W.H.d., Takumi, K., Teunis, P.F.M.v., and Vos, J.G. (1998) Dose-response relation for gastro-intestinal pathogens in an animal model. *RIVM Report n° 284550005*: p 1-36.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., and Van Impe, J.F. (2000) Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* **59**: 185-209.
- Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M., and Ang, D. (1994) Properties of heat shock proteins of *E. coli* and the autoregulation of the heat shock response. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Morimoto, R.I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. (eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 209-250.
- 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.
- Geue, L., Segura-Alvarez, M., Conraths, F.J., Kuczius, T., Bockemuhl, J., Karch, H., and Gallien, P. (2002) A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect* **129**: 173-185.
- Ghigo, J.M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442-445.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., and Roberts, T.A. (1988) Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int J Food Microbiol* **6**: 155-178.
- Gilgen, M., Hubner, P., Hofelein, C., Luthy, J., and Candrian, U. (1998) PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res Microbiol* **149**: 145-154.
- Gill, C.O., and Jones, T. (1998) Control of the contamination of pig carcasses by *Escherichia coli* from their mouths. *Int J Food Microbiol* **44**: 43-48.

- Glass, K.A., Loefelholz, J.M., Ford, 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.
- Glynn, J.R., Hornick, R.B., Levine, M.M., and Bradley, D.J. (1995) Infecting dose and severity of typhoid: analysis of volunteer data and examination of the influence of the definition of illness used. *Epidemiol Infect* **115**: 23-30.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776.
- Gonthier, A., Guerin-Faublee, V., Tilly, B., and Delignette-Muller, M.L. (2001) Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett Appl Microbiol* **33**: 352-356.
- 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.
- 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., 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., Mead, P.S., Van Gilder, T.J., Hunter, S.B., and Strockbine, N.A. (2001) Epidemiology of shiga toxin-producing *E.coli* infections in the United States: update, successes, challenges. In *Conference on Epidemiology of Verocytotoxigenic E.coli, organised par EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J.E., Wasteson, Y. and McDowell, D.A. (eds.) 8-10 th February 2001 Malahide, Dublin, Ireland.
- Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S., and Karch, H. (1992) Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **30**: 1807-1810.
- Guraya, R., Frank, J.F., and Hassan, A.N. (1998) Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in dairy foods stored at refrigeration temperatures. *J Food Prot* **61**: 1098-1102.
- Guth, B.E., Ramos, S., Cerqueira, A.M., Andrade, J.R., and Gomes, T.A.T. (2000) Characterization of Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil. In *4th International Symposium and Workshop on "Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections " Oct-nov 2000 Kyoto, Japan.*
- Guyon, R., Dorey, F., Collobert, J.F., Foret, J., Goubert, C., Mariau, V., and Malas, J.P. (2000) Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Science des aliments* **20**: 457-465.
- Guyon, R., Dorey, F., Malas, J.P., and Leclercq, A. (2001) Hazard analysis of *Escherichia coli* O157:H7 contamination during beef slaughtering in Calvados, France. *J Food Prot* **64**: 1341-1345.
- Gyles, C. (1998) Vaccines and Shiga Toxines-producing *Escherichia coli* in animals. In *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxines-producing Escherichia coli strains*. Kaper, J. and O'Brien, A.D. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 434-444.
- Haas, C.N. (1983) Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am J Epidemiol* **118**: 573-582.
- Haas, C.N., Rose, J.B., and Gerba, C.P. (1999) *Quantitative Microbial Risk Assessment*. New York: Wiley & Sons.
- Haas, C.N., Thayyar-Madabusi, A., Rose, J.B., and Gerba, C.P. (2000) Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **56**: 153-159.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhlendorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.
- Haeghebaert, S., De Parscau, L., Le Fur, J.M., Bouvet, P., Guenoden, R., Bastian, S., Vaillant, V., and De Valk, H. (2001) Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique pédiatriques, Département du Finistère, 1993-2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **37**: 181-183.

- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M., and Vaillant, V. (2002a) Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **23/2002**: 105-109.
- Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., and Grimont, F. (2002b) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique, chez les enfants de moins de 15 ans, en France en 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **29/2002**: 145-148.
- 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.
- Hall, G.A., Reynolds, D.J., Chanter, N., Morgan, J.H., Parsons, K.R., Debney, T.G., Bland, A.P., and Bridger, J.C. (1985) Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet Pathol* **22**: 156-163.
- Han, Y., Floros, J.D., Linton, R.H., Nielsen, S.S., and Nelson, P.E. (2001) Response surface modeling for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by chlorine dioxide gas treatments. *J Food Prot* **64**: 1128-1133.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H., and Paros, M.G. (1994) The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* **113**: 199-207.
- Hancock, D., Rice, D.H., Herriott, D.E., Besser, T.E., Ebel, E.D., and Carpenter, L.V. (1997a) Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. *J Food Prot* **60**: 363-366.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Herriott, D.E., and Tarr, P.I. (1997b) A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* **118**: 193-195.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E., and Carpenter, L.V. (1998) Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* **35**: 11-19.
- 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.
- Hara-Kudo, Y., Ikedo, M., Kodaka, H., Nakagawa, H., Goto, K., Masuda, T., Konuma, H., Kojima, T., and Kumagai, S. (2000a) Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2866-2872.
- Hara-Kudo, Y., Miyahara, M., and Kumagai, S. (2000b) Loss of O157 O antigenicity of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 surviving under starvation conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5540-5543.
- Harrison, J.A., Harrison, M.A.A., and Rose, R.A. (1998) Survival of *E.coli* O157:H7 in ground beef jerky assessed on two plating media. *J Food Prot* **61**: 11-13.
- Hartland, E.L., Batchelor, M., Delahay, R.M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I., and Frankel, G. (1999) Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* **32**: 151-158.
- Havelaar, A.H., Garssen, J., Takumi, K., Koedam, M., Dufrenne, J.B., Van Leusden, F.M., de la Fonteyne, L., and Vos, J.G. (2000) Dose-response relationships for gastro-intestinal pathogens in an animal model. *RIVM - Report 284550007*.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22.
- Hedberg, C., Angulo, F., Townes, J., Hadler, J.L., Vugia, D., Farley, M., and CDC/USDA/FDA (1997) Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Differences in *Escherichia coli* O157:H7 annual incidence among FoodNet active surveillance sites. In *5th international VTEC Producing Escherichia coli Meeting*. July 1997 Baltimore, USA.
- Heimer, S.R., Welch, R.A., Perna, N.T., Posfai, G., Evans, P.S., Kaper, J.B., Blattner, F.R., and Mobley, H.L. (2002) Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: evidence for regulation by fur and a trans-acting factor. *Infect Immun* **70**: 1027-1031.

- Heuvelink, A.E., van de Kar, N.C., Meis, J.F., Monnens, L.A., and Melchers, W.J. (1995) Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. *Epidemiol Infect* **115**: 1-14.
- Heuvelink, A.E., Bleumink, B., van den Biggelaar, F.L., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., and de Boer, E. (1998a) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *J Food Prot* **61**: 1597-1601.
- Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L., de Boer, E., Herbes, R.G., Melchers, W.J., Huis in 't Veld, J.H., and Monnens, L.A. (1998b) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol* **36**: 878-882.
- Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L., Zwartkruis-Nahuis, J., Herbes, R.G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W.J., Monnens, L.A., and de Boer, E. (1998c) Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol* **36**: 3480-3487.
- Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Beumer, R.R., and de Boer, E. (1999a) 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., Zwartkruis-Nahuis, J.T., van den Biggelaar, F.L., van Leeuwen, W.J., and de Boer, E. (1999b) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol* **52**: 67-75.
- Heuvelink, A.E., Van de Kar, N.C., Van Der Velden, T.J., Chart, H., and Monnens, L.A. (1999c) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in household members of children with hemolytic-uremic syndrome in The Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* **18**: 709-714.
- Heuvelink, A.E. (2000) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in humans and the food chain. Thèse de science - Université catholique de Nijmegen.
- Heuvelink, A.E., van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J.T., van Oosterom, R., Edink, K., van Duynhoven, Y.T., and de Boer, E. (2002) *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect* **129**: 295-302.
- Heyderman, R.S., Soriani, M., and Hirst, T.R. (2001) Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol* **9**: 262-266.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., and Phillips, A.D. (1998) Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* **66**: 1570-1578.
- Higgins, L.M., Frankel, G., Connerton, I., Goncalves, N.S., Dougan, G., and MacDonald, T.T. (1999) Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science* **285**: 588-591.
- Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., and Slutsker, L. (1999) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med* **159**: 1758-1764.
- 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.
- 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.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H., and Cliver, D. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 251-257.
- 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.
- Holcomb, D.L., Smith, M.A., Ware, G.O., Hung, Y.C., Brackett, R.E., and Doyle, M.P. (1999) Comparison of six dose-response models for use with food-borne pathogens. *Risk Anal* **19**: 1091-1100.
- Hood, S.K., and Zottola, E.A. (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol* **37**: 145-153.
- Huang, L., and Juneja, V.K. (2001) A new kinetic model for thermal inactivation of microorganisms: development and validation using *Escherichia coli* O157:H7 as a test organism. *J Food Prot* **64**: 2078-2082.

- 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.
- Hurley, B.P., Thorpe, C.M., and Acheson, D.W. (2001) Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* **69**: 6148-6155.
- Huseman, D., Gellermann, J., Vollmer, I., Ohde, I., Devaux, S., Ehrich, J.H., and Filler, G. (1999) Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow. *Pediatr Nephrol* **13**: 672-677.
- ICMSF (1996) Microbiological specifications of food pathogens. In *Microorganisms in food*. Vol. 5. London: Blackie academic and professional Publ.
- Igarashi, K., Ogasawara, J., Ito, H., Yutsudo, T., and Takeda, Y. (1987) Inhibition of elongation factor dependant aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VTI) from *Escherichia coli* O157H7 and by Shiga toxin. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 91-94.
- Igarashi, T. (2002) [Treatment in initial stage of VTEC infection]. *Nippon Rinsho* **60**: 1121-1125.
- Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Nagy, B., Deprez, P., and Pohl, P. (1997) Fimbrial colonisation factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease. *Adv Exp Med Biol* **412**: 175-183.
- Infectious Agents Surveillance Center (1996) Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, 1996, Japan. *Infect Agents Surveill Rep* **17**: 180-181.
- Irino, K., Gomes, T.A.T., Vaz, T.M.I., Kano, E., Kato, M.A.M.F., Dias, A.M.G., Goncalves, C.R., and Guth, B.E.C. (2000) Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroupes O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in Sao Paulo, Brazil. In *4th International Symposium on 'Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections'*. Oct-nov 2000 Kyoto, Japon.
- 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.
- Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Hayashi, S., Kubota, T., Fujii, N., and Takeshi, K. (1998) Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect Immun* **66**: 197-202.
- Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H., and Kumagai, S. (1998) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1532-1535.
- Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Ueno, N., Nagata, K., Togo, M., Terajima, J., and Watanabe, H. (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.
- Izumikawa, K., Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Takemura, H., Maesaki, S., Tomono, K., Igimi, S., Kaku, M., Yamada, Y., Kohno, S., and Kamihira, S. (1998) *Escherichia coli* O157 interactions with human intestinal Caco-2 cells and the influence of fosfomycin. *J Antimicrob Chemother* **42**: 341-347.
- Jacewicz, M.S., Trachtman, H., Newburg, D.S., and Acheson, D.W.K. (2000) Role of red blood cell globotriosylceramide in individual susceptibility to hemolytic uremic syndrome following infection with Shiga toxin-producing *E.coli*. In *100th General Meeting - American Society of Microbiology* Los Angeles, USA, pp. 64.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K., and Khakhria, R. (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.
- Jayarao, B.M., and Henning, D.R. (2001) Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J Dairy Sci* **84**: 2157-2162.
- 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.
- Jiang, X., Morgan, J., and Doyle, M.P. (2002) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2605-2609.

- Johnson, J.L., Brooke, C.L., and Fritschel, S.J. (1998) Comparison of the BAX for screening/E. coli O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of Escherichia coli O157:H7 in ground beef. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4390-4395.
- Johnson, J.R. (2000) Shigella and Escherichia coli at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* **49**: 583-585.
- Johnson, R.P., Clarke, R.C., Wilson, J.B., Read, S.C., Rahn, K., and Renwick, S.A. (1996) Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* **59**: 1112-1122.
- Jones, I.G., and Roworth, M. (1996) An outbreak of Escherichia coli O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health* **110**: 277-282.
- Jones, N.L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M.A., Perdue, M.H., Zanke, B.W., and Sherman, P.M. (2000) Escherichia coli Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**: G811-819.
- Jonsson, M.E., Aspan, A., Eriksson, E., and Vagsholm, I. (2001) Persistence of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *Int J Food Microbiol* **66**: 55-61.
- Jordan, D. (1998) Pre-slaughter control of beef carcass contamination with Escherichia coli O157:H7: a risk assessment approach. PhD Thesis - University of Guelph, Canada, pp. 236.
- Jordi, B.J., Boutaga, K., van Heeswijk, C.M., van Knapen, F., and Lipman, L.J. (2001) Sensitivity of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 329-334.
- Jores, J., Rumer, L., Kiessling, S., Kaper, J.B., and Wieler, L.H. (2001) A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at pheV in bovine Shiga toxin-producing Escherichia coli strain O103:H2. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 75-79.
- Juneja, V.K., Snyder, O.P., Jr., and Marmer, B.S. (1997) Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Int J Food Microbiol* **35**: 231-237.
- Juneja, V.K., Klein, P.G., and Marmer, B.S. (1998) Heat shock and thermotolerance of Escherichia coli O157:H7 in a model beef gravy system and ground beef. *J Appl Microbiol* **84**: 677-684.
- Juneja, V.K., and Marmer, B.S. (1999) Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7 D- and z value determinations in turkey, lamb and pork. *Food. Res. Int.* **32**: 23-28.
- Juneja, V.K., Marmer, B.S., and Eblen, B.S. (1999) Predictive model of combined effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium pyrophosphate on the heat resistance of *E.coli* O157:H7. *J Food Safety* **19**: 147-160.
- Juneja, V.K., Eblen, B.S., and Marks, H.M. (2001) Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of salmonella in poultry of different fat levels. *Int J Food Microbiol* **70**: 37-51.
- Junkins, A.D., and Doyle, M.P. (1992) Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic Escherichia coli. *Curr Microbiol* **25**: 9-17.
- 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.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., and Ray, B. (1992) Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pedicin, Ach, and nisin. *Lett Appl Microbiol* **15**: 239-243.
- Kaneko, M., Nambu, T., and Tokoro, M. (2001) Behaviour of pathogenic E. coli and Salmonella enteritidis in small domestic sewage treatment apparatus ("Johkasou"). *Water Sci Technol* **43**: 191-193.
- Kang, D.H. (2002) Development of membrane filter holder (MFH) method for recovery of heat-injured Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. *Lett Appl Microbiol* **34**: 62-66.
- Kaper, J.B., Elliott, S., Sperandino, V., Perna, N.T., Mayhew, G.F., and Blattner, F.R. (1998) Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E.coli strains*. Kaper, J.B. and O'Brien, A.D. (eds). ASM, Washington, DC, pp. 163-182.
- Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., O'Brien, A.D., Tacket, C.O., and Levine, M.M. (1987) A plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* **55**: 455-461.

- Karch, H., and Meyer, T. (1989) Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **27**: 1180-1186.
- Karch, H., Bohm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., and Heesemann, J. (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H. *J Clin Microbiol* **31**: 1200-1205.
- Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S., and Datz, M. (1996) Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* **34**: 516-519.
- Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschlager, T., and Hacker, J. (1999) A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun* **67**: 5994-6001.
- 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.
- 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.
- Karpman, D., Connell, H., Svensson, M., Scheutz, F., Alm, P., and Svanborg, C. (1997) The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Infect Dis* **175**: 611-620.
- Kasrazadeh, M., and Genigeorgis, C. (1995) Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int J Food Microbiol* **25**: 289-300.
- Kassenborgh, H., Hedberg, C., Evans, M., Chin, G., Fiorentino, T.R., Vugia, D., Bardsley, M., Slutsker, L., and Griffin, P.M. (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.
- Kausche, F.M., Dean, E.A., Arp, L.H., Samuel, J.E., and Moon, H.W. (1992) An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *Am J Vet Res* **53**: 281-287.
- Keene, W.E., McAnulty, J.M., Williams, L.P., C., H.F., Hedberg, K., and Fleming, D.W. (1993) A two-restaurant outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis associated with the consumption of mayonnaise. In *The Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 33, pp. 354.
- Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., and Fleming, D.W. (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., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, P., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., and Flezming, D.W. (1995) A newly recognised source of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Gastroenterology* **108**: 1597-1602.
- Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T., and Doyle, M.P. (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Jama* **277**: 1229-1231.
- Kehl, K.S., Havens, P., Behnke, C.E., and Acheson, D.W. (1997) Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **35**: 2051-2054.
- Kelly, J., Oryshak, A., Wenetsek, M., Grabiec, J., and Handy, S. (1990) The colonic pathology of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Am J Surg Pathol* **14**: 87-92.
- Kennedy, M.H., Rabatsky-Ehr, T., Thomas, S.M., Lance-Parker, S., Molhe-Boetani, J., Smith, K., Keene, W., Sparling, P., Hardnett, F.P., Mead, P., and group, E.F.W. (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.

- Kenny, B. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241.
- Kenny, B. (2001) The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell Microbiol* **3**: 499-510.
- Khan, A., Yamasaki, S., Sato, T., Ramamurthy, T., Pal, A., Datta, S., Chowdhury, N.R., Das, S.C., Sikdar, A., Tsukamoto, T., Bhattacharya, S.K., Takeda, Y., and Nair, G.B. (2002) Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerg Infect Dis* **8**: 54-62.
- Kim, H.H., Samadpour, M., Grimm, L., Clausen, C.R., Besser, T.E., Baylor, M., Kobayashi, J.M., Neill, M.A., Schoenkecht, F.D., and Tarr, P.I. (1994) Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991. *J Infect Dis* **170**: 1606-1609.
- Kim, J., Nietfeldt, J., and Benson, A.K. (1999) Octamer-based genome scanning distinguishes a unique subpopulation of *Escherichia coli* O157:H7 strains in cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13288-13293.
- Kim, J., Nietfeldt, J., Ju, J., Wise, J., Fegan, N., Desmarchelier, P., and Benson, A.K. (2001) Ancestral divergence, genome diversification, and phylogeographic variation in subpopulations of sorbitol-negative, beta-glucuronidase-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *J Bacteriol* **183**: 6885-6897.
- Kim, T., Silva, J.L., and Chen, T.C. (2002) Effects of UV irradiation on selected pathogens in peptone water and on stainless steel and chicken meat. *J Food Prot* **65**: 1142-1145.
- Kirke White, H., Brooke, C.L., and Mrozinski, P.M. (1997) The effect of novobiocin on the recovery *Escherichia coli* O157:H7 from pre-spiked fruit juices using the BAX® for screening *E. coli* O157:H7 assay. In *AOAC 111th Meeting*.
- Kita, E., Yunou, Y., Kurioka, T., Harada, H., Yoshikawa, S., Mikasa, K., and Higashi, N. (2000) Pathogenic mechanism of mouse brain damage caused by oral infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **68**: 1207-1214.
- Kiyokawa, N., Taguchi, T., Mori, T., Uchida, H., Sato, N., Takeda, T., and Fujimoto, J. (1998) Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxins 1 and 2. *J Infect Dis* **178**: 178-184.
- Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.W., and Steinruck, 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.
- Knudsen, D.M., Yamamoto, S.A., and Harris, L.J. (2001) Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *J Food Prot* **64**: 1483-1488.
- Knutton, S., Lloyd, D.R., and McNeish, A.S. (1987) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**: 69-77.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., and McNeish, A.S. (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**: 1290-1298.
- 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.
- Kogure, K., and Ikemoto, E. (1997) [Wide occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in natural freshwater environment]. *Nippon Saikingaku Zasshi* **52**: 601-607.
- Kohli, H.S., Chaudhuri, A.K., Todd, W.T., Mitchell, A.A., and Liddell, K.G. (1994) A severe outbreak of *E. coli* O157 in two psychogeriatric wards. *J Public Health Med* **16**: 11-15.
- Kolling, G.L., and Matthews, K.R. (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843-1848.
- Kolling, G.L., and Matthews, K.R. (2001) Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3928-3933.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., and Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**: 775-779.

- Koodie, L., and Dhople, A.M. (2001) Acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 and its survival in apple juice. *Microbios* **104**: 167-175.
- 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.
- Krotola, J.S., and Conner, D.E. (1997) Heat inactivation of *E.coli* O157:H7 in turkey meat as affected by sodium chloride, sodium lactate, polyphosphate and fat content. *J Food Prot* **60**: 898-902.
- Krysinski, E.P., Brown, L.J., and Marchisello, T.J. (1992) Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection* **55**: 246-251.
- Kudva, I.T., Hatfield, P.G., and Hovde, C.J. (1997a) Characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* **35**: 892-899.
- Kudva, I.T., Hunt, C.W., Williams, C.J., Nance, U.M., and Hovde, C.J. (1997b) Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3878-3886.
- Kudva, I.T., Blanch, K., and Hovde, C.J. (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3166-3174.
- Kurioka, T., Yunou, Y., and Kita, E. (1998) Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect Immun* **66**: 1726-1734.
- Kurokawa, K., Tani, K., Ogawa, M., and Nasu, M. (1999) Abundance and distribution of bacteria carrying *stIII* gene in natural river water. *Lett Appl Microbiol* **28**: 405-410.
- Lahti, E., Eklund, M., Ruutu, P., Siitonen, A., Rantala, L., Nuorti, P., and Honkanen-Buzalski, T. (2002) Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 189-195.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., and Thuault, D. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol* **73**: 219-237.
- Le Saux, N., Spika, J.S., Friesen, B., Johnson, I., Melnychuck, D., Anderson, C., Dion, R., Rahman, M., and Tostowarky, W. (1993) Ground beef consumption in noncommercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* **167**: 500-502.
- 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.
- Leclerc, V. (2000) Le dénombrement des *Salmonelles* dans les plats témoins congelés ou réfrigérés. Apport de données quantifiées dans le cadre de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives - étude DGAI. AFSSA - Maisons-Alfort, France, pp. 1-92.
- Leclerc, V. (2002) Enumeration of low doses of injured *Salmonella* and exposure assessment. In *International Symposium Salmonella and Salmonellosis*. Colin, P. and Clement, G. (eds.) May 2002 - Saint-Brieuc, France: Zoopole Développement - ISPAIA, pp. 73-77.
- Leclerc, V., Le Querrec, F., Andral, B., and Vernozy-Rozand, C. (2002) Epidémiologie des *Escherichia coli* vérocytotoxiques et alimentation. *Bulletin épidémiologique AFSSA-DGAI* **4**: 4-6.
- Leclerc, V., Le Querrec, F., Vernozy, C., and Andral, B. (2003) Surveillance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France depuis 1995 : recherche dans les aliments, l'environnement et chez l'animal : Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000 - Institut de Veille Sanitaire, pp. 187-191.
- Lee, J.I., Lee, H.J., and Lee, M.H. (2002a) Synergistic effect of nisin and heat treatment on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **65**: 408-410.
- Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., and Calderon, R.L. (2002b) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ* **51**: 1-47.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., and Hancock, D.D. (2001a) Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3053-3057.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Merrill, N.L., Rice, D.H., and Hancock, D.D. (2001b) Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *J Dairy Sci* **84**: 1856-1862.
- Leriche, V., and Carpentier, B. (1995) Viable but non culturable *Salmonella typhimurium* within single and binary species biofilms in response to chlorine treatment. *J Food Prot* **58**: 1186-1191.

- Leriche, V. (1999) Minimisation de l'implantation de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces des ateliers alimentaires par la création et l'entretien de biofilms. Thèse de doctorat de 3ème cycle - Université de Bourgogne, Dijon, pp. 169-182.
- Leung, P.H., Yam, W.C., Ng, W.W., and Peiris, J.S. (2001) The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiol Infect* **126**: 173-179.
- Levine, P., Rose, B., Green, S., Ransom, G., and Hill, W. (2001) Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990 to 1999. *J Food Prot* **64**: 1188-1193.
- 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.
- Li, Y., Brackett, R.E., Chen, J., and Beuchat, L.R. (2001) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15 degrees C. *J Food Prot* **64**: 305-309.
- Licence, K., Oates, K.R., Synge, 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.
- Liddell, K.G. (1997) *Escherichia coli* O157: outbreak in central Scotland. *Lancet* **349**: 502-503.
- Lilliard, H.S. (1979) Levels of chlorine dioxide of equivalent bactericidal effect in poultry processing water. *J. Food Sci.* **44**: 1594.
- 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, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., and Takeda, Y. (1993) Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* **37**: 543-548.
- 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.
- Lindgren, S.W., Samuel, J.E., Schmitt, C.K., and O'Brien, A.D. (1994) The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* **62**: 623-631.
- 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.
- Lisle, J.T., Broadaway, S.C., Prescott, A.M., Pyle, B.H., Fricker, C., and McFeters, G.A. (1998) Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4658-4662.
- Lisle, J.T., Pyle, B.H., and McFeters, G.A. (1999) The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* **29**: 42-47.
- Little, C.L., and de Louvois, J. (1998) The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J Appl Microbiol* **85**: 177-186.
- Liu, X.H., Youssef, A.E., and Chism, G.W. (1997) Inactivation of *E. coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. *J Food Safety* **16**: 287-299.
- Locking, M.E., O'Brien, S.J., Reilly, W.J., Wright, E.M., Campbell, D.M., Coia, J.E., Browning, L.M., and Ramsay, C.N. (2001) Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. *Epidemiol Infect* **127**: 215-220.
- 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.
- Loirat, C. (2001) Syndrome Hémolytique et Urémique typique post diarrhée : aspects cliniques. *Arch Pediatr* **8** Suppl 4: 776s-784s.
- Lopez-Gonzales, V., Murano, P.S., Brennan, R.E., and Murano, E.A. (1999) Influence of various commercial packaging conditions on survival of *E. coli* O157:H7 to irradiation by electron beam versus gamma rays. *J Food Prot* **62**: 10-15.

- Louie, M., de Azavedo, J., Clarke, R., Borczyk, A., Lior, H., Richter, M., and Brunton, J. (1994) Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect* **112**: 449-461.
- Louie, M., Read, S., Simor, A.E., Holland, J., Louie, L., Ziebell, K., Brunton, J., and Hii, J. (1998) Application of multiplex PCR for detection of non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in bloody stools: identification of serogroups O26 and O111. *J Clin Microbiol* **36**: 3375-3377.
- 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. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.
- Ludwig, K., Ruder, H., Bitzan, M., Zimmermann, S., and Karch, H. (1997) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a large family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**: 238-241.
- 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.
- Lung, A.J., Lin, C.M., Kim, J.M., Marshall, M.R., Nordstedt, R., Thompson, N.P., and Wei, C.I. (2001) Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting. *J Food Prot* **64**: 1309-1314.
- Lytle, D.A., Rice, E.W., Johnson, C.H., and Fox, K.R. (1999) Electrophoretic mobilities of *Escherichia coli* O157:H7 and wild-type *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3222-3225.
- Macdonald, C., Drew, J., Carlson, R., Dzogan, S., Tataryn, S., Macdonald, A., Ali, A., Amhed, R., Easy, R., Clark, C., and Rodgers, F. (2000) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 leading to the recall of retail ground beef--Winnipeg, Manitoba, May 1999. *Can Commun Dis Rep* **26**: 109-111.
- MacDonald, I.A., Gould, I.M., and Curnow, J. (1996) Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157: a 3-year prospective study. *Epidemiol Infect* **116**: 279-284.
- MacDonald, K.L., O'Leary, M.J., Cohen, M.L., Norris, P., Wells, J.G., Noll, E., Kobayashi, J.M., and Blake, P.A. (1988) *Escherichia coli* O157:H7, an emerging gastrointestinal pathogen. Results of a one-year, prospective, population-based study. *Jama* **259**: 3567-3570.
- Machado, J., Grimont, F., and Grimont, P.A. (2000) Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res Microbiol* **151**: 535-546.
- Mackenzie, A.M., Lebel, P., Orrbine, E., Rowe, P.C., Hyde, L., Chan, F., Johnson, W., and McLaine, P.N. (1998) Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. The SYNORB Pk Study investigators. *J Clin Microbiol* **36**: 1608-1611.
- Mackenzie, A., Orrbine, E., Hyde, L., Benoit, M., Chan, F., Park, C., Alverson, J., Lembke, A., Hoban, D., and Kennedy, W. (2000) Performance of the ImmunoCard STAT! *E. coli* O157:H7 test for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in stools. *J Clin Microbiol* **38**: 1866-1868.
- MacLeod, D.L., Gyles, C.L., and Wilcock, B.P. (1991) Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet Pathol* **28**: 66-73.
- Mafart, P. (1999) Les modèles de destruction thermique des microorganismes. *Science des Aliments* **19**: 131-146.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., and Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int J Food Microbiol* **72**: 107-113.
- Mak, P.P., Ingham, B.H., and Ingham, S.C. (2001) Validation of apple cider pasteurization treatments against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **64**: 1679-1689.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C.G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S., and Shinagawa, H. (1998) Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* **5**: 1-9.
- Makino, S., Kobori, H., Asakura, H., Watarai, M., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., and Tsukamoto, T. (2000a) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect* **125**: 55-61.

- Makino, S.I., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., and Itoh, K. (2000b) Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Appl Environ Microbiol* **66**: 5536-5539.
- Mao, Y., Doyle, M.P., and Chen, J. (2001) Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 3811-3815.
- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat, C., Goulet, P., Sansonetti, P.J., and Elion, J. (1993) Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J Clin Microbiol* **31**: 296-301.
- Maroeska, D., Te Loo, D.M., Monnens, L., and *al.*, e. (2000) Binding and transfert of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* **95**: 3396-3402.
- 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.
- Martineau, G.P. (1997) *Maladies d'élevage des porcs*. France-Agricole (ed), pp. 479 p.
- Martinez, A., Oliva, J.M., Panella, E., Hernandez-Pezzi, G., and Soler, P. (2001) Outbreak of *E.coli* O157:H7 infection in Spain. *Eurosurveillance 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.
- Masters, C.I., Shallcross, J.A., and Mackey, B.M. (1994) Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* **77**: 73-79.
- Masuda, S., Hara-Kudo, Y., and Kumagai, S. (1998) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce, a fermented seasoning. *J Food Prot* **61**: 657-661.
- Mathewson, J.J., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Satterwhite, T.K., and Winsor, D.K. (1986) Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J Infect Dis* **154**: 524-527.
- 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.
- Mattick, A.T.R., and Hirsch, A. (1947) Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* **2**: 5-7.
- Maule, A. (2000) Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 71S-78S.
- Maurer, J.J., Schmidt, D., Petrosko, P., Sanchez, S., Bolton, L., and Lee, M.D. (1999) Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2954-2960.
- McCarthy, J., Holbrook, R., and Stephens, P.J. (1998) An improved direct plate method for the enumeration of stressed *Escherichia coli* O157:H7 from food. *J Food Prot* **61**: 1093-1097.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1664-1668.
- McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**: 399-407.
- McGowan, K.L., Wickersham, E., and Strockbine, N.A. (1989) *Escherichia coli* O157:H7 from water. *Lancet* **1**: 967-968.
- McIngvail, S.C., Elhanafi, D., and Drake, M.A. (2002) Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable shiga-toxin producing *E.coli*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 799-806.
- 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.

- McKee, M.L., and O'Brien, A.D. (1995) Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect Immun* **63**: 2070-2074.
- 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.
- McKellar, R.C., and Lu, X. (2001) A probability of growth model for *Escherichia coli* O157:H7 as a function of temperature, pH, acetic acid, and salt. *J Food Prot* **64**: 1922-1928.
- McKillip, J.L., and Drake, M. (2000) Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J Food Prot* **63**: 855-859.
- McMeekin, T., Olley, J., Ross, T., and Ratkowsky, D.A. (1993) Predictive microbiology : theory and applications. Inc., J.W.S. (ed).
- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S., and Ratkowsky, D.A. (1987) Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *J Appl Bacteriol* **62**: 543-550.
- McQuigge, M., Ellis, A., Stratton, J., Aramini, J., Middleton, D., Jamieson, F., Ciebin, B.W., Majowicz, S., Middleton, B., Patterson, D., and Paton, J. (2000) A large outbreak of *E.coli* O157:H7 and *Campylobacter* infections due to contaminated municipal drinking water. In *4th International Symposium and Workshop on "Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections "* Oct-nov 2000 Kyoto, Japan.
- Mechie, S.C., Chapman, P.A., and Siddons, C.A. (1997) A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect* **118**: 17-25.
- 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.
- Melton-Celsa, A.R., Darnell, S.C., and O'Brien, A.D. (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **64**: 1569-1576.
- Membre, J.M., Ross, T., and McMeekin, T. (1999) Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Lett Appl Microbiol* **28**: 216-220.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M.P., Mitchell, S.E., and Kresovich, S. (1996) Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157: H7. *Int J Food Microbiol* **32**: 103-113.
- Mermin, J.H., and Griffin, P.M. (1999) Public health in crisis: outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Japan. *Am J Epidemiol* **150**: 797-803; discussion 804-795.
- 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.
- Michel, P., Wilson, J.B., Martin, S.W., Clarke, R.C., McEwen, S.A., and Gyles, C.L. (1999) Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiol Infect* **122**: 193-200.
- Michel, P., Wilson, J.B., Martin, S.W., Clarke, R.C., McEwen, S.A., and Gyles, C.L. (2000) Estimation of the under-reporting rate for the surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 cases in Ontario, Canada. *Epidemiol Infect* **125**: 35-45.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., and Yanagawa, H. (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.
- Midgley, J., Fegan, N., and Desmarchelier, P. (1999) Dynamics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in feedlot cattle. *Lett Appl Microbiol* **29**: 85-89.
- Midgley, J., and Desmarchelier, P. (2001) Pre-slaughter handling of cattle and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Lett Appl Microbiol* **32**: 307-311.
- Miedouge, M., Hacini, J., Grimont, F., and Watine, J. (2000) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* urinary tract infection associated with hemolytic-uremic syndrome in an adult and possible adverse effect of ofloxacin therapy. *Clin Infect Dis* **30**: 395-396.

- Milford, D.V., Taylor, C.M., Guttridge, B., Hall, S.M., Rowe, B., and Kleanthous, H. (1990) Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 1: Clinical and epidemiological aspects. *Arch Dis Child* **65**: 716-721.
- Miliwebsky, E., Wainsztein, R., Chinen, I., Leardini, N., Chillemi, G., Baschkier, A., and Rivas, M. (2000) Hemolytic uremic syndrome in Argentina. In *4th International Symposium on 'Shiga Toxin (verocytotoxin)- producing Escherichia coli infections'*. oct-nov 2000 Kyoto, Japan.
- Milne, L.M., Plom, A., Strudley, I., Pritchard, G.C., Crooks, R., Hall, M., Duckworth, G., Seng, C., Susman, M.D., Kearney, J., Wiggins, R.J., Mouldsdale, M., Cheasty, T., and Willshaw, G.A. (1999) *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* **2**: 22-26.
- Miyagi, K., Omura, K., Ogawa, A., Hanafusa, M., Nakano, Y., Morimatsu, S., and Sano, K. (2001) Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiol Infect* **126**: 129-133.
- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Takade, A., and Yoshida, S. (1999) Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Arch Microbiol* **172**: 63-67.
- Mohle-Boetani, J.C., Farrar, J.A., Werner, S.B., Minassian, D., Bryant, R., Abbott, S., Slutsker, L., and Vugia, D.J. (2001) *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann Intern Med* **135**: 239-247.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., and Giannella, R.A. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340-1351.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., and Caprioli, A. (1998) Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **36**: 840-842.
- Morabito, S., Dell'Omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T., and Caprioli, A. (2001) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol* **82**: 275-283.
- 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.
- Morgan, G.M., Newman, C., Palmer, S.R., Allen, J.B., Shepherd, W., Rampling, A.M., Warren, R.E., Gross, R.J., Scotland, S.M., and Smith, H.R. (1988) First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O 157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect* **101**: 83-91.
- Moschcowitz, E. (1925) An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med* **36**: 89.
- Moxley, R.A., and Francis, D.H. (1986) Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**: 339-346.
- Muniesa, M., and Jofre, J. (2000) Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 197-200.
- Murano, E.A., and Pierson, M.D. (1992) Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *E.coli* O157:H7. *J Food Prot* **55**: 171-175.
- Murinda, S.E., Roberts, R.F., and Wilson, R.A. (1996) Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3196-3202.
- Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Ivey, S.J., Gillespie, B.E., Almeida, R.A., Draughon, F.A., and Oliver, S.P. (2002) Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *J Food Prot* **65**: 752-759.
- Mustapha, A., Ariyapitipun, T., and Clarke, A.D. (2002) Survival of *E.coli* O157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *J. Food Sci.* **67**: 262-267.
- Nagano, I., Kunishima, M., Itoh, Y., Wu, Z., and Takahashi, Y. (1998) Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* **42**: 371-376.

- Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Kojima, T., Ikedo, M., Kodaka, H., Konuma, H., and Kumagai, S. (2000) Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. *Int J Food Microbiol* **60**: 107-110.
- Nakano, M., Iida, T., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Yasunaga, T., Hayashi, T., and Honda, T. (2001) Association of the urease gene with enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups. *J Clin Microbiol* **39**: 4541-4543.
- Nakazawa, M., and Akiba, M. (1999) Swine as a potential reservoir of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg Infect Dis* **5**: 833-834.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- 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.
- Nauta, M.J., Evers, E.G., Takumi, K., and Havelaar, A.H. (2001) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands. RIVM - report n°257851003, pp. 1-169.
- Neaves, P., Deacon, J., and Bell, C. (1994) A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int Dairy J* **4**: 679-696.
- Neely, M.N., and Friedman, D.I. (1998) Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* **28**: 1255-1267.
- 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.
- Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T., and Haruki, K. (2000) Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* **38**: 2440-2442.
- Oberst, R.D., Hays, M.P., Bohra, L.K., Phebus, R.K., Yamashiro, C.T., Paszko-Kolva, C., Flood, S.J., Sargeant, J.M., and Gillespie, J.R. (1998) PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3389-3396.
- 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., Greig, A., Main, R., Reilly, W.J., and Thomson-Carter, F.M. (2001b) A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H-phage type 8 in hospital. *J Hosp Infect* **49**: 167-172.
- O'Connor, D. (2002) Rapport de la commission d'enquête sur Walkerton : Les événements de mai 2000 et les questions connexes. Ministère du procureur général de l'Ontario - Toronto, Canada, pp. 36.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T., and Takeda, Y. (2001) Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int J Food Microbiol* **68**: 135-140.
- 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.
- Ogden, L.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J., and Lewis, D. (2001) The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *Int J Food Microbiol* **66**: 111-117.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K., and Hayashi, T. (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* **9**: 481-485.
- Oie, S., Kamiya, A., Tomita, M., Katayama, A., Iwasaki, A., and Miyamura, S. (1999) Efficacy of disinfectants and heat against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbios* **98**: 7-14.
- Okrend, A.J.G., Rose, B.E., and Lattuada, C.P. (1990) A research note : use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-1-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* **53**: 941-943.

- Oliver, J.D., and Bockian, R. (1995) In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2620-2623.
- Olsen, S.J., Miller, G., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., and Mead, P. (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.
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., MacDonald, S., and et al. (1994) An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand J Infect Dis* **26**: 675-684.
- Ostroff, S.M., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Shipman, L.D., Greene, K.D., Wells, J.G., Lewis, J.H., Blake, P.A., and Kobayashi, J.M. (1990) A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Washington State. *Am J Epidemiol* **132**: 239-247.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., and Caprioli, A. (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**: 64-71.
- 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.
- Pai, C.H., Kelly, J.K., and Meyers, G.L. (1986) Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **51**: 16-23.
- Pal, A., Ghosh, S., Ramamurthy, T., Yamasaki, S., Tsukamoto, T., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., and Takeda, Y. (1999) Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian J Med Res* **110**: 83-85.
- Palumbo, S.A., Call, J.E., Schultz, F.J., and Williams, A.C. (1995) Minimum and Maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food. Protect.* **58**: 352-356.
- Park, S., Worobo, R.W., and Durst, R.A. (2001) *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit Rev Biotechnol* **21**: 27-48.
- Parma, A.E., Sanz, M.E., Vinas, M.R., Cicuta, M.E., Blanco, J.E., Boehringer, S.I., Vena, M.M., Roibon, W.R., Benitez, M.C., Blanco, J., and Blanco, M. (2000) Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Vet Microbiol* **72**: 269-276.
- Parry, S.M., and Salmon, R.L. (1998) Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis* **4**: 657-661.
- Parry, S.M., Salmon, R.L., Willshaw, G.A., and Cheasty, T. (1998) Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157. *Lancet* **351**: 1019-1022.
- Paton, A.W., Paton, J.C., Goldwater, P.N., and Manning, P.A. (1993) Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 3063-3067.
- Paton, A.W., Bourne, A.J., Manning, P.A., and Paton, J.C. (1995) Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect Immun* **63**: 2450-2458.
- 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.
- Paton, A.W., Voss, E., Manning, P.A., and Paton, J.C. (1997) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Infect Immun* **65**: 3799-3805.
- Paton, A.W., Manning, P.A., Woodrow, M.C., and Paton, J.C. (1998) Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun* **66**: 5580-5586.
- Paton, A.W., and Paton, J.C. (1998a) 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., and Paton, J.C. (1999a) Molecular characterization of the locus encoding biosynthesis of the lipopolysaccharide O antigen of *Escherichia coli* serotype O113. *Infect Immun* **67**: 5930-5937.
- Paton, A.W., and Paton, J.C. (1999b) Direct detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **37**: 3362-3365.
- 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 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**: 6999-7009.
- Paton, J.C., and Paton, A.W. (1998b) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**: 450-479.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R., and Gilmour, A. (1995) Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *J Food Prot* **58**: 524-529.
- Patterson, M.F., and Kilpatrick, D.J. (1998) The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J Food Prot* **61**: 432-436.
- Paunio, M., Pebody, R., Keskimaki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E., and Leinikki, P. (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., Wells, J.G., Siegler, R.L., Brewer, E.D., Hannon, D., and 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., Leino, T., Chalmers, R., de Jong, B., Donnelly, M., Fisher, I., Gilham, C., Graverson, L., Cheasty, T., Willshaw, G., Navarro, M., Salmon, R., Leinikki, P., Wall, P., and Bartlett, C. (1999) An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists ; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect* **123**: 217-223.
- Peleg, M. (2000) Microbial survival curves - the reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times. *Food Res. Int.* **33**: 531-538.
- Pell, A.N. (1997) Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* **80**: 2673-2681.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Blattner, F.R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**: 3810-3817.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., and Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Phan, Q., McCarthy, T., Mschar, P., Welles, C., Howard, R., Rabatsky-Ehr, T., and Hadler, J.L. (2002) Epidemiology of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections in Connecticut (February, 1 2000 - January, 31 2001). In *3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases* March 2002 Atlanta, Georgia - USA.
- Phillips, A.D., and Frankel, G. (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**: 1496-1500.
- Phillips, A.D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., and Frankel, G. (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**: 377-381.
- Phillips, D., Sumner, J., Alexander, J.F., and Dutton, K.M. (2001) Microbiological quality of Australian sheep meat. *J Food Prot* **64**: 697-700.
- Pierard, D., Van Damme, L., Moriau, L., Stevens, D., and Lauwers, S. (1997) Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4585-4587.
- Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., and Lauwers, S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**: 3317-3322.

- Pierard, D., Crowcroft, N., De Bock, S., Potters, D., Crabbe, G., Van Loock, F., and Lauwers, S. (1999) A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect* **122**: 359-365.
- Pilipcinec, E., Tkacikova, L., Naas, H.T., Cabadaj, R., and Mikula, I. (1999) Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol (Praha)* **44**: 455-456.
- Plunkett, G., 3rd, Rose, D.J., Durfee, T.J., and Blattner, F.R. (1999) Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* **181**: 1767-1778.
- Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., and Rozee, K.R. (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **28**: 540-545.
- Pond, T.J., Wood, D.S., Mumin, I.M., Barbut, S., and Griffiths, M.W. (2001) Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in uncooked, semidry, fermented sausage. *J Food Prot* **64**: 759-766.
- Pongratz, A., Schwarzkopf, A., Hahn, H., Heesemann, J., Karch, H., and Doll, W. (1994) [The effect of the pipe material of the drinking water system on the frequency of Legionella in a hospital]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **195**: 483-488.
- Powell, M.R., Ebel, E., Schlosser, W., Walderhaug, M., and Kause, J. (2000) Dose-response envelope for *Escherichia coli* O157:H7. *Quantitative Microbiology* **2**: 141-163.
- Pradel, N., De Champs, C., Palcoux, J.B., Sirot, J., Forestier, C., Joly, B., Scheutz, F., and Livrelli, V. (2000a) [Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region]. *Arch Pediatr* **7** Suppl 3: 544s-550s.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., and Forestier, C. (2000b) Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* **38**: 1023-1031.
- Pradel, N. (2001) *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines : étude épidémiologique, recherche des caractéristiques des souches pathogènes par comparaison moléculaire et hybridation soustractive. Thèse de doctorat de 3ème cycle - Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne.
- Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C., and Livrelli, V. (2001) Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2460-2468.
- Pradel, N., Leroy-Setrin, S., Joly, B., and Livrelli, V. (2002) Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2316-2325.
- Prakash, A. (2000) Polyphosphates. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu, A.S. (ed). Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press, pp. 725-738.
- Presser, K.A., Ross, T., and Ratkowsky, D.A. (1998) Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1773-1779.
- Preston, M., Borczyk, A., Davidson, R., McGeer, A., Bertoli, J., Harris, S., Thususka, J., Goldman, C., Green, K., Low, D., Proctor, P., Johnson, W., and Khakhria, R. (1997) Ecllosion d'infections à *Escherichia coli* O157:H7 liée à un lysotype rare, en milieu hospitalier -Ontario. *Relevé des maladies transmissibles au Canada* **23**.
- 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.
- Proulx, F., Turgeon, J.P., Delage, G., Lafleur, L., and Chicoine, L. (1992) Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr* **121**: 299-303.
- Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., and Moon, H.W. (2000) Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10325-10329.
- Pupo, G.M., Karaolis, D.K., Lan, R., and Reeves, P.R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect Immun* **65**: 2685-2692.

- 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.
- Ramachandran, V., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J., and Djordjevic, S.P. (2001) The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J Clin Microbiol* **39**: 1932-1937.
- Rampersad, F.S., Laloo, S., La Borde, A., Maharaj, K., Sookhai, L., Teelucksingh, J., Reid, S., McDougall, L., and Adesiyun, A.A. (1999) Microbial quality of oysters sold in Western Trinidad and potential health risk to consumers. *Epidemiol Infect* **123**: 241-250.
- Randall, L.P., Wray, C., and McLaren, I.M. (1997) Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *Vet Rec* **140**: 112-115.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., and Chandler, R.E. (1983) Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol* **154**: 1222-1226.
- Ratkowsky, D.A., and Ross, T. (1995) Modelling the bacterial growth / no growth interface. *Lett Appl Microbiol* **20**: 29-33.
- Ray, P.E., and Liu, X.H. (2001) Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **16**: 823-839.
- 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.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S., Hii, J., McEwen, S., and Gyles, C.L. (1992) Polymerase chain reaction for detection of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food source. *Mol Cell Probes* **6**: 153-161.
- 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.
- Reilly, W.J., Smith, H.R., Gill, O.N., and Fisher, I.S.T. (2000) Enter-net : real-time international VTEC surveillance. In *4th International Symposium on 'Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections'* oct-nov 2000 - Kyoto, Japan.
- Reinders, R.D., Evers, E.G., de Jonge, R., and Van Leusden, F.M. (2002) Variation in the numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef.: RIVM - report n°149106009, pp. p 1-97.
- Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyk, A., Spika, J.S., Rahn, K., McFadden, K., Brouwer, A., Copps, A., and 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.
- Repetto, H.A. (1997) Epidemic hemolytic-uremic syndrome in children. *Kidney Int* **52**: 1708-1719.
- Rice, D.H., Ebel, E.D., Hancock, D.D., Besser, T.E., Herriott, D.E., and Carpenter, L.V. (1997) *Escherichia coli* O157 in cull dairy cows on farms and at slaughter. *J Food Prot* **60**: 1386-1387.
- Rice, E.W., Johnson, C.H., Wild, D.K., and Reasoner, D.J. (1992) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak oh hemorrhagic colitis. *Letters in Applied Microbiology* **15**: 38-40.
- Rice, E.W., Clark, R.M., and Johnson, C.H. (1999) Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis* **5**: 461-463.
- Richards, M.S., Corkish, J.D., Sayers, A.R., McLaren, I.M., Evans, S.J., and Wray, C. (1998) Studies of the presence of verocytotoxic *Escherichia coli* O157 in bovine faeces submitted for diagnostic purposes in England and Wales and on beef carcasses in abattoirs in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* **120**: 187-192.
- Richardson, S.E., Karmali, M.A., Becker, L.E., and Smith, C.R. (1988) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol* **19**: 1102-1108.
- Richardson, S.E., Rotman, T.A., Jay, V., Smith, C.R., Becker, L.E., Petric, M., Olivieri, N.F., and Karmali, M.A. (1992) Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infect Immun* **60**: 4154-4167.
- Rigsbee, W., Simpson, L.M., and Oliver, J.D. (1997) Detection of the viable but non culturable state *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Safety* **16**: 225-262.

- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., and Cohen, M.L. (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.
- Riordan, D.C., Duffy, G., Sheridan, J.J., Whiting, R.C., Blair, I.S., and McDowell, D.A. (2000) Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1726-1729.
- Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., and Levine, M.M. (1999) Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol* **37**: 778-781.
- Rippey, S.R., Chandler, L.A., and Watkins, W.D. (1987) Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shell-fish. *J Food Prot* **50**: 685-690.
- Ritter, A., Blum, G., Emody, L., Kerenyi, M., Bock, A., Neuhierl, B., Rabsch, W., Scheutz, F., and Hacker, J. (1995) tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**: 109-121.
- Roberts, T.A. (1995) Microbial growth and survival : developments in predictive modelling. *Int. Biodeter. Biodegr.* : 297-309.
- Rocelle, M., Clavero, S., and Beuchat, L.R. (1995) Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3268-3273.
- 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.
- Rodrigue, D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barrett, T.J., and Griffin, P.M. (1995) A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* **172**: 1122-1125.
- Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., and Lange, M. (2001) Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int J Food Microbiol* **63**: 217-223.
- Rosenshine, I. (1998) Species specificity and tissue tropism of EPEC and related pathogens. *Trends Microbiol* **6**: 388.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., and Flandrois, J.P. (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied. Environ. Microbiol.* **61**: 610-616.
- Rosso, L., Zuber, E., Pichat, C., and Flandrois, J.P. (1997) Simple relationship between acid dissociation constant and minimal pH for microbial growth in laboratory medium. *Int J Food Microbiol* **35**: 75-81.
- Rowe, P.C., Orrbine, E., Lior, H., Wells, G.A., and McLaine, P.N. (1993) Diarrhoea in close contacts as a risk factor for childhood haemolytic uraemic syndrome. The CPKDRC co-investigators. *Epidemiol Infect* **110**: 9-16.
- Rowe, P.C., Orrbine, E., Ogborn, M., Wells, G.A., Winther, W., Lior, H., Manuel, D., and McLaine, P.N. (1994) Epidemic *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome in a Canadian inuit community: intestinal illness in family members as a risk factor. *J Pediatr* **124**: 21-26.
- Ruy, J.H., and Beuchat, L.R. (1998) Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *E.coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *Int J Food Microbiol* **45**: 185-193.
- Ryan, C.A., Tauxe, R.V., Hisek, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W., Jr., Smith, P.W., Wright, G.F., and Blake, P.A. (1986) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* **154**: 631-638.
- Sable, S., Pons, A.M., Gendron-Gaillard, S., and Cottenceau, G. (2000) Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *E.coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4595-4597.

- Safarikova, M., and Safarik, I. (2001) Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. *Lett Appl Microbiol* **33**: 36-39.
- Sage, J.R., and Ingham, S.C. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. *J Food Prot* **61**: 1181-1183.
- Sakai-city (1999) Survey results of *Escherichia coli* O157:H7 in a public water area. Environment in Sakai in 1998.
- Salter, M.A., Ross, T., and McMeekin, T.A. (1998) Applicability of a model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **85**: 357-364.
- Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., and McMeekin, T.A. (2000) Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *Int J Food Microbiol* **61**: 159-167.
- Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A., and Tarr, P.I. (1994) Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1038-1040.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., and Smith, G.C. (2002) Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat decontamination washing fluids and potential effects of organic acid interventions on the microbial ecology of the meat plant environment. *J Food Prot* **65**: 33-40.
- Sanaa, M., and Cerf, O. (2002) La démarche d'analyse quantitative des risques de maladies infectieuses transmises par les aliments. *Epidémiologie et santé animale* **41**: 157-168.
- Sanath Kumar, H., Otta, S.K., and Karunasagar, I. (2001) Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett Appl Microbiol* **33**: 334-338.
- Sasaki, J., Kita, T., Ishita, K., Uchisawa, H., and Matsue, H. (1999) Antibacterial activity of garlic powder against *Escherichia coli* O-157. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **45**: 785-790.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., and Fasano, A. (1996) Enterohemolytic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterohemolytic *E. coli*. *J Infect Dis* **173**: 1019-1022.
- Scheutz, F., Olesen, B., Engberg, J., Munk Petersen, A., Molbach, K., Schiellerup, P., and Gerner-Smidt, P. (2001) Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) from danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. In *Epidemiology of Verocytotoxigenic E.coli organised by EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y. and McDowell, D. (eds.) Malahide, Dublin, Ireland 8-10 th February 2001.
- Schlundt, J. (2000) Comparison of microbiological risk assessment studies published. *Int J Food Microbiol* **58**: 197-202.
- Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.
- Schmidt, H., and Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic- uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**: 2364-2367.
- Schmidt, H., Bielaszewska, M., and Karch, H. (1999a) Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3855-3861.
- Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P.I., Frosch, M., and Karch, H. (1999b) Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* **179**: 115-123.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., and Karch, H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1205-1208.
- Schoenen, D., and Wehse, A. (1988) [Microbial contamination of water by pipe and hose material. 1. Detection of colony count changes]. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B]* **186**: 108-117.
- Schoeni, J.L., and Doyle, M.P. (1994) Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2958-2962.

- Schoonderwoerd, M., Clarke, R.C., van Dreumel, A.A., and Rawluk, S.A. (1988) Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM. *Can J Vet Res* **52**: 484-487.
- Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D.D., McDermott, P.F., Walker, R.D., and Meng, J. (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* **68**: 576-581.
- Schurman, R.D., Hariharan, H., Heaney, S.B., and Rahn, K. (2000) Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle slaughtered on Prince Edward Island. *J Food Prot* **63**: 1583-1586.
- Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A., and Gross, R.J. (1988) Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol* **25**: 237-243.
- 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.
- Seo, K.H., and Frank, J.F. (1999) Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J Food Prot* **62**: 3-9.
- Shanks, P.L. (1938) An unusual condition affecting the digestive organs of the pigs. *Vet Rec* **50**: 356-358.
- Sharma, R.R., Demirci, A., Beuchat, L.R., and Fett, W.F. (2002) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat treatment. *J Food Prot* **65**: 447-451.
- Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A., and Casey, T.A. (1999) Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxinogenic *E. coli*. *Mol Cell Probes* **13**: 291-302.
- Sharp, J.C., Ritchie, L.D., Curnow, J., and Reid, T.M. (1994) High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J Infect* **29**: 343-350.
- 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.
- Shere, J.A., Kaspar, C.W., Bartlett, K.J., Linden, S.E., Norell, B., Francey, S., and Schaefer, D.M. (2002) Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle housed in a confined environment following waterborne inoculation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1947-1954.
- Sherman, P., Soni, R., Petric, M., and Karmali, M. (1987) Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **55**: 1824-1829.
- Sherman, P., Cockerill, F., 3rd, Soni, R., and Brunton, J. (1991) Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **59**: 890-899.
- Shinagawa (1997) Correspondance and problem for Enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* **46**: 104-112.
- Shinagawa, K., Kanehira, M., Omoe, K., Matsuda, I., Hu, D., Widiastih, D.A., and Sugii, S. (2000) Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan. *Vet Microbiol* **76**: 305-309.
- 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.
- Sidjabat-Tambunan, H., and Bensink, J.C. (1997) Verotoxin-producing *Escherichia coli* from the faeces of sheep, calves and pigs. *Austr Vet J* **4**: 292-293.
- Siegler, R.L. (1994) Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* **125**: 511-518.
- Siegler, R.L. (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* **42**: 1505-1529.
- Siegler, R.L., Pysher, T.J., Lou, R., Tesh, V.L., and Taylor, F.B., Jr. (2001) Response to Shiga toxin-1, with and without lipopolysaccharide, in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *Am J Nephrol* **21**: 420-425.
- Sjogren, R., Neill, R., Rachmilewitz, D., Fritz, D., Newland, J., Sharpnack, D., Colleton, C., Fondacaro, J., Gemski, P., and Boedeker, E. (1994) Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology* **106**: 306-317.

- 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.
- Slutsker, L., Ries, A.A., Maloney, K., Wells, J.G., Greene, K.D., and Griffin, P.M. (1998) A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. *J Infect Dis* **177**: 962-966.
- Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., Milton, T., and Klopfenstein, T. (2001a) Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J Food Prot* **64**: 1899-1903.
- Smith, H.R., Cheasty, T., Roberts, D., Thomas, A., and Rowe, B. (1991) Examination of retail chickens and sausages in Britain for vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2091-2093.
- 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 Bakteriol* **278**: 436-444.
- Smith, H.R., Willshaw, G.A., Cheasty, T., and O'Brien, S.J. (2001b) Vero Cytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. In *Conference on Epidemiology of Verocytotoxigenic E.coli, organised par EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J.E., Wasteson, Y. and McDowell, D.A. (eds.) Malahide, Dublin, Ireland 8-10 th February 2001.
- Smith, H.W., and Halls, S. (1968) The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *J Med Microbiol* **1**: 45-59.
- Smith, H.W., Green, P., and Parsell, Z. (1983) Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J Gen Microbiol* **129** (Pt 10): 3121-3137.
- Smith, K., Swanson, E., Wagstrom, E., Leano, F., Boxrud, D., Adams, J., Besser, J., Danila, R., and Hull, H.F. (2002) Three outbreaks of *E.coli* O157 infections due to retail ground beef in Minnesota, 2000 : detection, investigation and characteristics. In *3rd International Conference of Emerging Infectious Diseases* March 2002 Atlanta, GA USA.
- Smulders, F.J., and Greer, G.G. (1998) Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int J Food Microbiol* **44**: 149-169.
- Sofos, J.N. (1989) Sorbate Food preservatives. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 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.
- Solomon, E.B., Potenski, C.J., and Matthews, K.R. (2002a) Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J Food Prot* **65**: 673-676.
- Solomon, E.B., Yaron, S., and Matthews, K.R. (2002b) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol* **68**: 397-400.
- Somers, E.B., Schoeni, J.L., and Wong, A.C. (1994) Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **22**: 269-276.
- Sommer, R., Lhotsky, M., Haider, T., and Cabaj, A. (2000) UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *J Food Prot* **63**: 1015-1020.
- 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.
- 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., 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.

- Splittstoesser, D.F., McLellan, M.R., and Churey, J.J. (1996) Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Prot* **59**: 226-229.
- Starr, M., Bennett-Wood, V., Bigam, A.K., de Koning-Ward, T.F., Bordun, A.M., Lightfoot, D., Bettelheim, K.A., Jones, C.L., and Robins-Browne, R.M. (1998) Hemolytic-uremic syndrome following urinary tract infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* : case report and review. *Clin Infect Dis* **27**: 310-315.
- 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.
- Stefan, R., Raggetli, S., and Untermann, F. (2000) Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stools samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *J Appl Microbiol* **88**: 335-341.
- 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.
- 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., and Ogden, I.D. (2002) Quantitative risk assessment of human infection from *Escherichia coli* O157 associated with recreational use of animal pasture. *Int J Food Microbiol* **75**: 39-51.
- 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.
- 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.
- Su, C., and Brandt, L.J. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* **123**: 698-714.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., and Braxton, D.S. (1995) Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int J Food Microbiol* **25**: 29-49.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., and Beaumont, A.L. (1997) Predictive modelling of *Escherichia coli* O157:H7: inclusion of carbon dioxide as a fourth factor in a pre-existing model. *Int J Food Microbiol* **37**: 113-120.
- 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., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D., Jr., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer, A., Jr., Wells, J.G., and et al. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* **117**: 812-819.
- 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.
- Synge, B.A., Hopkins, G.F., Reilly, W.J., and Sharp, J.C. (1993) Possible link between cattle and *E coli* O157 infection in a human. *Vet Rec* **133**: 507.
- Synge, B.A., and Hopkins, G.F. (1994) Studies of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in Scotland and associated out-breaks. In *Recent Advances in Verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Karmali, M.A. and Goglio, A.G. (eds): Elsevier Science B. V., pp. 65-68.
- Takeuchi, K., and Frank, J.F. (2000) Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J Food Prot* **63**: 434-440.
- Takeuchi, K., Matute, C.M., Hassan, A.N., and Frank, J.F. (2000) Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *J Food Prot* **63**: 1433-1437.
- 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.
- Tanaka, Y., Yamaguchi, N., and Nasu, M. (2000) Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry. *J Appl Microbiol* **88**: 228-236.

- Taormina, P.J., and Beuchat, L.R. (1999a) Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J Food Prot* **62**: 318-324.
- Taormina, P.J., and Beuchat, L.R. (1999b) Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals. *J Food Prot* **62**: 850-856.
- 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.
- Tardy, F., Andral, B., and Martel, J.L. (2000) Antimicrobial susceptibility status of O157 and O157:H7 strains isolated from bovine slaughtering. Comparison with *E. coli* strains from sick bovine, a preliminary study (Poster). In *Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti infectieuse* Paris, France, pp. 194.
- Tarr, P.I., Neill, M.A., Clausen, C.R., Watkins, S.L., Christie, D.L., and Hickman, R.O. (1990) *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* **162**: 553-556.
- 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., Baylor, M.R., and Besser, T.E. (2000) *hly*_{EHEC}: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**: 1400-1407.
- Tatewaki, M., Nakao, K., Nogami, H., and Abe, J. (2000) A subunit of Shiga toxin type 2 induces interleukine-12 expression from peripheral blood mononuclear cells via activated nuclear transcription factor κ B. In *4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin producing Escherichia coli infections"*. Abstract 316 Kyoto, Japan.
- Tauxe, R.V. (1998) Public Health perspective on immunoprophylactic strategies for *Escherichia coli* O157:H7: Who or What would we immunize? In *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxins-producing Escherichia coli strains*. Kaper, J. and O'Brien, A.D. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 445-452.
- Taylor, J.H., Rogers, S.J., and Holah, J.T. (1999) A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 degrees C. *J Appl Microbiol* **87**: 718-725.
- Taylor, M. (1990) The haemolytic uraemic syndrome : a clinical perspective. *PHLS Microbiol Digest* **7**: 133-140.
- Te Loo, D.M., Heuvelink, A.E., De Boer, E., Nauta, J., Van der Walle, J., Schroder, C., Van Hinsbergh, V.W., Chart, H., Van de Kar, N.C., and Van den Heuvel, L.P. (2001) Vero cytotoxin binding to polymorphonuclear leukocytes among households with children with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **184**: 446-450.
- Tesh, V.L., Samuel, J.E., Perera, L.P., Sharefkin, J.B., and O'Brien, A.D. (1991) Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* **164**: 344-352.
- Tesh, V.L. (1998) Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of molecular crosstalk. *Trends Microbiol* **6**: 228-233.
- Teunis, P.F., Nagelkerke, N.J., and Haas, C.N. (1999) Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Anal* **19**: 1251-1260.
- Teunis, P.F., and Havelaar, A.H. (2000) The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Anal* **20**: 513-520.
- Thayer, D.W., and Boyd, G. (1993) Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1030-1034.
- Thomas, A., Smith, H.R., and Rowe, B. (1993) Use of digoxigenin-labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human variant genes to differentiate Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O157. *J Clin Microbiol* **31**: 1700-1703.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., and Delves-Broughton, J. (2000) Nisin. In *Natural Food Antimicrobial systems*. Naidu, A.S. (ed). Boca Raton, London, New York, Washington D. C.: CRC Press, pp. 463-524.

- Thomson, J.S., Hodge, D.S., and Borczyk, A.A. (1990) Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* **28**: 2165-2168.
- 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. (2001a) Occurrence of verotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy heifers grazing an irrigated pasture. *Toxicology* **159**: 159-169.
- Thran, B.H., Hussein, H.S., Hall, M.R., and Khaiboullina, S.F. (2001b) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot* **64**: 1613-1616.
- Tilden, J., Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., and Morris, J.G., Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**: 1142-1145.
- Todd, W.T., and Dundas, S. (2001) The management of VTEC O157 infection. *Int J Food Microbiol* **66**: 103-110.
- Tomicka, A., Chen, J., Barbut, S., and Griffiths, M.W. (1997) Survival of bioluminescent *E.coli* O157:H7 in a model system representing fermented sausage production. *J Food Prot* **60**: 1487-1492.
- Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F., and Kaper, J.B. (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 5416-5427.
- Toth, I., Cohen, M.L., Rumschlag, H.S., Riley, L.W., White, E.H., Carr, J.H., Bond, W.W., and Wachsmuth, I.K. (1990) Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect Immun* **58**: 1223-1231.
- Tozzi, A.E., and Fisher, I. (1999) Epidemiology of VTEC infections in Europe : Enter-Net and other data. *Acta Clinica Belgica* **54**: 34.
- Tozzi, A.E., Caprioli, A., Minelli, F., Morabito, S., Marziano, M.L., Goriotti, S., Pichiorri, T., Gianviti, A., De Petris, L., and Rizzoni, G. (2001) Verocytotoxin producing *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome in Italy. In *Epidemiology of Verototoxigenic E.coli organised by EU Concerted Action (CT98-3935)*. Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y. and McDowell, D. (eds.) 8-10th February 2001 Malahide, Dublin, Ireland.
- 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.
- 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.
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, R.V., and Griffin, P.M. (1999) Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect* **122**: 185-192.
- Tzipori, S., Wachsmuth, I.K., Chapman, C., Birden, R., Brittingham, J., Jackson, C., and Hogg, J. (1986) The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis* **154**: 712-716.
- Tzipori, S., Karch, H., Wachsmuth, K.I., Robins-Browne, R.M., O'Brien, A.D., Lior, H., Cohen, M.L., Smithers, J., and Levine, M.M. (1987) Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **55**: 3117-3125.
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M.S., de Montigny, L., Kaper, J.B., and Donohue-Rolfe, A. (1995) The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **63**: 3621-3627.
- Uhlich, G.A., Keen, J.E., and Elder, R.O. (2001) Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2367-2370.
- Ukuku, D.O., and Fett, W.F. (2002) Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. *J Food Prot* **65**: 1093-1099.

- 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.
- Uljas, H.E., and Ingham, S.C. (1999) Combinations of intervention treatments resulting in 5-log₁₀-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organisms in apple cider. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1924-1929.
- Uljas, H.E., Schaffner, D.W., Duffy, S., Zhao, L., and Ingham, S.C. (2001) Modeling of combined processing steps for reducing *Escherichia coli* O157:H7 populations in apple cider. *Appl Environ Microbiol* **67**: 133-141.
- Upton, P., and Coia, J.E. (1994) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* **344**: 1015.
- USDA (1993) Report on the *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in the Western States. United States Department of Agricultural - Food safety and inspection service.
- USDA-APHIS (1994) *Escherichia coli* O157:H7 in US dairy calves. United States Department of Agricultural - NAHMS N138-O194.
- Uyttendaele, M., Grangette, C., Rogerie, F., Pasteau, S., Debevere, J., and Lange, M. (1998) Influence of cold stress on the preliminary enrichment time needed for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef by PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1640-1643.
- Uyttendaele, M., Jozwik, E., Tuteneil, A., De Zutter, L., Uradzinski, J., Pierard, D., and Debevere, J. (2001a) 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.
- Uyttendaele, M., Taverniers, I., and Debevere, J. (2001b) Effect of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **66**: 31-37.
- Vaillant, V., and Espié, E. (2002) Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Etude cas-témoins 2000-2001. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France, pp. 61.
- Valcour, J.E., Michel, P., McEwen, S.A., and Wilson, J.B. (2002) Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Emerg Infect Dis* **8**: 252-257.
- Van de Kar, N.C., Roelofs, H.G., Muijtens, H.L., Tolboom, J.J., Roth, B., Proesmans, W., Reitsma-Bierens, W.C., Wolff, E.D., Karmali, M.A., Chart, H., and Monnens, L.A. (1996) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe. *Eur J Pediatr* **155**: 592-595.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J., and Klashinsky, S. (2001) Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J* **42**: 714-720.
- Van Gerwen, S.J., and Zwietering, M.H. (1998) Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J Food Prot* **61**: 1541-1549.
- van Wijnen, J.H., Clausing, P., and Brunekreef, B. (1990) Estimated soil ingestion by children. *Environ Res* **51**: 147-162.
- Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O., Hung, Y.C., and Doyle, M.P. (1999a) Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4276-4279.
- Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O., Hung, Y.C., and Doyle, M.P. (1999b) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *J Food Prot* **62**: 857-860.
- Vermeyen, H.M., Karch, H., Brandis, M., and Zimmerrhackl, L.B. (2000) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections : following transmission routes. *Pediatr Nephrol* **14**: 73-83.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., Boutrand-Loei, S., Meyrand, A., and Richard, Y. (1997) Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol* **25**: 442-446.
- Vernozy-Rozand, C., and Ray-Gueniot, S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7 étude clinique, pathogénique, épidémiologique et prévention des accidents alimentaires. *Rev Med Vet* **148**: 89-98.

- Vernozy-Rozand, C., and Montet, M.P. (2001) *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
- Vernozy-Rozand, C., Bouvet, J., Montet, M.P., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy-Cruchaudet, C., and Richard, Y. (2002) Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in France (Poster). In *102th General Meeting of American Society for Microbiology* May, 19-20 Salt-Lake City, USA.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., and Lejeune, P. (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* **180**: 2442-2449.
- Villarino, A., Bouvet, O.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., and Grimont, P.A.D. (2000) Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res Microbiol* **151**: 755-768.
- Vogeli, P., Bertschinger, H.U., Stamm, M., Stricker, C., Hagger, C., Fries, R., Rapacz, J., and Stranzinger, G. (1996) Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Anim Genet* **27**: 321-328.
- 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., Burris, J.A., and O'Brien, A.D. (1990a) Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **58**: 2438-2445.
- Wadolowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E., and O'Brien, A.D. (1990b) 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.
- Wagner, P.L., Acheson, D.W., and Waldor, M.K. (1999) Isogenic lysogens of diverse shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxin. *Infect Immun* **67**: 6710-6714.
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W., Waldor, M.K., and Friedman, D.I. (2001) Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* **183**: 2081-2085.
- Waldor, M.K. (1998) Bacteriophage biology and bacterial virulence. *Trends Microbiol* **6**: 295-297.
- Walls, I., and Scott, V.N. (1996) Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food. Protect.* **59**: 1331-1335.
- Wang, G., Zhao, T., and Doyle, M.P. (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2567-2570.
- Wang, G., and Doyle, M.P. (1998) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* **61**: 662-667.
- Warburton, D.W., Austin, J.W., Harrison, B.H., and Sanders, G. (1998) Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *J Food Prot* **61**: 948-952.
- Warrner, M., Kuo, K., Williams, L., and Ruden, R. (1996) Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Morb. Mortal. Wkly. Rep* **45**: 437-439.
- Wasteson, Y., Arnemo, J.M., Johansen, B.K., Vold, L., Mathiesen, S.D., Olsen, M.A., Wiig, O., and Derocher, A.E. (1999) Analysis of faecal samples from wild animals for verocytotoxin producing *Escherichia coli* and *E coli* O157. *Vet Rec* **144**: 646-647.
- Waters, J.R., Sharp, J.C., and Dev, V.J. (1994) Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987-1991. *Clin Infect Dis* **19**: 834-843.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L., and Bark, D.H. (1994) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot* **57**: 629-631.
- Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R., and Morris, G.K. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* **18**: 512-520.
- Whiting, R.C., and Cygnarowicz-Provost, M. (1992) A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology* **9**: 269-277.
- Whiting, R.C., and Bagi, L.K. (2002) Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**: 291-295.

- Whiting, R.C., and Golden, M.H. (2002) Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int J Food Microbiol* **75**: 127-133.
- Whitmore, B.B., and Naidu, A.S. (2000) Thiosulfates. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu, A.S. (ed). Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press, pp. 349-379.
- Whittam, T.S. (1993) Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin-producing *E.coli* strains. In *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga-toxin-producing E.coli strains*. Kaper, J.B. and O'Brien, A.D. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 195-209.
- 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.
- WHO (1997) Consultation on the Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. World Health Organization - Geneva, Switzerland.
- Wieler, L.H., Vieler, E., Erpenstein, C., Schlapp, T., Steinruck, H., Bauerfeind, R., Byomi, A., and Baljer, G. (1996) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol* **34**: 2980-2984.
- 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.
- Wieler, L.H., Schwanitz, A., Vieler, E., Busse, B., Steinruck, H., Kaper, J.B., and Baljer, G. (1998) Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J Clin Microbiol* **36**: 1604-1607.
- Williams, R.C., Isaacs, S., Decou, M.L., Richardson, E.A., Buffett, M.C., Slinger, R.W., Brodsky, M.H., Ciebin, B.W., Ellis, A., and Hockin, J. (2000) Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *E. coli O157:H7 Working Group. Cmaj* **162**: 1409-1413.
- Willshaw, G.A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirlwell, J., Cheasty, T., and Rowe, B. (1993) Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J Appl Bacteriol* **75**: 420-426.
- Willshaw, G.A., Thirlwell, J., Jones, A.P., Parry, S., Salmon, R.L., and Hickey, M. (1994) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Lett Appl Microbiol* **19**: 304-307.
- Wilson, J., Spika, J., Clarke, R., McEwen, S., Johnson, R., Rahn, K., Renwick, S., Karmali, M., Lior, H., Alves, D., Gyles, C., and Sandhu, K. (1998) Verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *Can Commun Dis Rep* **24**: 17-20.
- Wilson, J.B., McEwen, S.A., Clarke, R.C., Leslie, K.E., Wilson, R.A., Waltner-Toews, D., and Gyles, C.L. (1992) Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* **108**: 423-439.
- Wilson, J.B., Clarke, R.C., Renwick, S.A., Rahn, K., Johnson, R.P., Karmali, M.A., Lior, H., Alves, D., Gyles, C.L., Sandhu, K.S., McEwen, S.A., and Spika, J.S. (1996) Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J Infect Dis* **174**: 1021-1027.
- Winsor, D.K., Jr., Ashkenazi, S., Chiovetti, R., and Cleary, T.G. (1992) Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains to a human colonic epithelial cell line (T84). *Infect Immun* **60**: 1613-1617.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., and Tarr, P.I. (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* **342**: 1930-1936.
- Wood, R., Donaghy, M., and Dundas, S. (2001) Monitoring patients in the community with suspected *Escherichia coli* O157 infection during a large outbreak in Scotland in 1996. *Epidemiol Infect* **127**: 413-420.
- Woods, J.B., Schmitt, C.K., Darnell, S.C., Meysick, K.C., and O'Brien, A.D. (2002) Ferrets as a model system for renal disease secondary to intestinal infection with *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Infect Dis* **185**: 550-554.
- Wray, C., McLaren, I., and Pearson, G.R. (1989) Occurrence of 'attaching and effacing' lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic *E coli*. *Vet Rec* **125**: 365-368.

- Wright, J.R., Sumner, S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D., and Zoeklein, B.W. (2000) Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. *J Food Prot* **63**: 563-567.
- 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.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.S., Linton, R.H., and Sheard, M.A. (1999) Comparison of the Baranyi model with the Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* **16**: 269-279.
- Yamamoto, S.A., and Harris, L.J. (2001) The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Int J Food Microbiol* **67**: 89-96.
- Yamamura, A., Muari, A., Takamatsu, H., and Watabe, K. (2000) Antimicrobial effect of chemical preservatives on enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7. *Journal of Health Science* **46**: 204-208.
- Yamasaki, C., Natori, Y., Zeng, X.T., Ohmura, M., Yamasaki, S., and Takeda, Y. (1999) Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett* **442**: 231-234.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4414-4420.
- Yokoyama, K., Horii, T., Yamashino, T., Hashikawa, S., Barua, S., Hasegawa, T., Watanabe, H., and Ohta, M. (2000) Production of shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 139-144.
- Yoshida, T., Fukada, M., Koide, N., Ikeda, H., Sugiyama, T., Kato, Y., Ishikawa, N., and Yokochi, T. (1999) Primary cultures of human endothelial cells are susceptible to low doses of Shiga toxins and undergo apoptosis. *J Infect Dis* **180**: 2048-2052.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A., and Siddons, C.A. (1993) Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* **39**: 155-158.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., and Karch, H. (2002a) Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**: 1441-1446.
- Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., and Schmidt, H. (2002b) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **40**: 4486-4492.
- Zhao, S., Meng, J., Doyle, M.P., Meinersman, R., Wang, G., and Zhao, P. (1996) A low molecular weight outer-membrane protein of *Escherichia coli* O157:H7 associated with adherence to INT407 cells and chicken caeca. *J Med Microbiol* **45**: 90-96.
- 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.
- 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., Shere, J., and Garber, L. (1995) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1290-1293.
- Zschock, M., Hamann, H.P., Kloppert, B., and Wolter, W. (2000) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* **31**: 203-208.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Van't Riek, K. (1990) Modelling of the bacterial growth curve. *Applied. Environ. Microbiol.* **56**.
- Zwietering, M.H., Wiltjes, T., De Wit, J.C., and Van't Riek, K. (1992) A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food. Protect.* **55**: 973-979.
- Zwietering, M.H., de Wit, J.C., and Notermans, S. (1996) Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *Int J Food Microbiol* **30**: 55-70.