



HAL
open science

Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

Antoine Vimont

► **To cite this version:**

Antoine Vimont. Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00139179

HAL Id: tel-00139179

<https://theses.hal.science/tel-00139179>

Submitted on 29 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

6 mars 2007

par

Antoine VIMONT

**Optimisation de la recherche des
Escherichia coli producteurs de
Shiga-toxines (STEC)**

Directeur de thèse : Madame le Dr Marie-Laure Delignette-Muller

Co-Directeur de thèse : Madame le Pr Christine Vernozzy-Rozand

JURY :

PRESIDENT : Monsieur Patrick Potier, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon I

RAPPORTEUR : Monsieur Gilles Salvat, Directeur de l'AFSSA - Ploufragan

RAPPORTEUR : Madame Marie Simon-Cornu, Chargée de Recherche AFSSA – Maisons Alfort

EXAMINATEUR : Monsieur Michel Federighi, Professeur - ENV Nantes

EXAMINATEUR : Madame Marie-Laure Delignette-Muller, Maître de Conférence - ENV Lyon

EXAMINATEUR : Madame Christine Vernozzy-Rozand, Professeur - ENV Lyon

INVITÉE : Madame Valérie Livrelli, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
Vice-Président du Conseil Scientifique
Vice-Président du Conseil d'Administration
Vice-Président du Conseil des Etudes
et de la Vie Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET
M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur R. GARRONE
M. le Professeur G. ANNAT

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
DURAND

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

UFR de Médecine Lyon-Nord

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

UFR de Médecine Lyon-Sud

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

UFR d'Odontologie

Directeur : M. O. ROBIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche
en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

UFR de Biologie

Directeur : M. le Professeur H. PINON

UFR de Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

UFR de Génie Electrique et des Procédés

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

UFR Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P.

HANTZPERGUE

UFR de Mathématiques

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

UFR d'Informatique

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

UFR de Chimie Biochimie

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

UFR STAPS

Directeur : M. le Professeur R.

MASSARELLI

Observatoire de Lyon

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Institut des Sciences et des Techniques
de l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

IUT A

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

IUT B

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont...

Aristote

REMERCIEMENTS

C'est le devoir de chaque homme de rendre au monde au moins autant qu'il en a reçu.

N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès. Essayez de devenir un homme qui a de la valeur.

Einstein

A **Monsieur le Professeur Patrick POTIER**, de l'Université Claude Bernard Lyon I. Nous sommes très sensibles à l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse. Qu'il reçoive ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A **Madame le Docteur Marie-Laure DELIGNETTE-MULLER**, notre Directrice de thèse. Nous avons eu le privilège de bénéficier de ses conseils précieux, de son écoute permanente et surtout de sa patience. Nous sommes reconnaissants de la confiance qu'elle nous a accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues. Nous tenons à lui assurer toute notre admiration et notre amitié.

A **Madame le Professeur Christine VERNZOZY-ROZAND**, notre co-Directrice de thèse, qu'elle reçoive toute l'expression de notre reconnaissance pour nous avoir proposé ce sujet de recherche et, pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude. Nous tenons à lui assurer toute notre admiration et notre amitié.

A **Monsieur le Docteur Gilles SALVAT**, Directeur de l'AFSSA Ploufragan / Brest, pour nous avoir, il y a quelques années, ouvert les voies de la microbiologie et de la recherche. Nous le remercions, d'une part, de la confiance qu'il nous a accordée depuis l'IUT et, d'autre part, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Nous sommes reconnaissants pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et nous tenons à lui assurer tout notre respect et toute notre amitié.

A **Madame le Docteur Marie SIMON-CORNU**, Chargée de recherche à l'AFSSA Maisons-Alfort. Nous la remercions d'avoir contribué à mener à bien ce projet en participant au comité de pilotage et d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Qu'elle trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A **Madame le Professeur Valérie LIVRELLI**, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand. Nous sommes reconnaissants de l'honneur et du plaisir qu'elle nous a fait en participant au comité de pilotage et au jury de notre thèse. Qu'elle reçoive ici nos sincères remerciements.

A **Monsieur le Professeur Michel FEDERIGHI**, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Nous sommes reconnaissants de l'honneur et du plaisir qu'il nous a fait en participant au jury de notre thèse. Qu'il reçoive ici nos sincères remerciements.

Que chacun d'entre vous soit ici vivement remercié de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury et le plaisir d'assister à ma soutenance. Recevez ici, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt que vous avez portés à ce travail.

Je remercie...

Vincent ATRACHE for his permanent support, his communicative enthusiasm and our motivating discussions. Many thanks for all you have done.

Alexandre Mérieux, Vincent ATRACHE pour m'avoir permis de réaliser un travail d'innovation *via* le projet TEMP'O157:H7 et ainsi d'acquérir une expérience précieuse dans ce domaine d'activité.

Grégory DEVULDER, Florence GORSE, Pascal MONTES, David MOSTICONE, Jean-Louis PITTET, Jean-Claude RAYMOND, Thierry SOFIA, Catherine HUGUET et, avec eux, toute la société bioMérieux pour leur précieuse collaboration.

Pierre BEAUBOIS, pour son aide, sa disponibilité, son dynamisme et ses compétences qui nous ont permis d'honorer et de mener à bien diverses collaborations.

Christophe DUFOUR, Russ FLOWERS, Mohammad KOOHMARAIE pour les suggestions et informations essentielles qu'ils nous ont apportées au cours de ce doctorat.

Muriel ELIASZEWICZ, Christine VERNOZY-ROZAND, Marie-Laure DELIGNETTE-MULLER pour avoir initié ce travail, ainsi que l'**AFSSA Maisons-Alfort** pour son soutien financier.

Toute l'équipe de l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, **Christine V-R., Marie-Laure, Marie-Pierre, Bastien, Ammara, Delphine, Christine B., Christine M-C.** et tous les stagiaires (**JB, Benoît, Audrey, Nina, Mathieu, Marion, Sarah**) ainsi que **Corinne LAZIZZERA** de l'**AFSSA Lyon**, qui m'ont permis, par leur aide, leur soutien et leur dévouement, de mener à bien ce projet de recherche.

Un travail scientifique ne saurait se réduire à une réalisation isolée. Que chacun d'entre vous soit ici très sincèrement remercié d'avoir contribué à l'aboutissement de ce projet de recherche.

Je remercie...

Mes parents, pour leur amour, leur persévérance (avec un enfant, je le conçois, quelque peu turbulent) et leur soutien depuis toujours. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour ;

Mes sœurs, Donovan et Ronan, pour leur aide et leurs précieux conseils ainsi que pour la complicité qui nous unit ;

Nadya, pour sa présence à mes côtés dans les bons comme dans les moments plus difficiles, ses encouragements, sa compréhension et, tout simplement son amour ;

... sans eux, rien n'aurait été possible... je leur dédie cette thèse.

Daniel, Véronique, Pierre et Antoine pour m'avoir accueilli dans cette région Rhône-Alpes, où il fait (presque) « aussi bon vivre » que dans ma région natale, la Bretagne !

Marie-Laure et Christine, pour leur patience, leur encadrement précieux et inestimable, leurs conseils, leurs convictions respectives, leur dynamisme et leur aide pour « l'après thèse ».

Marie-Pierre, pour avoir troqué des heures de sommeil contre des milliers de boîtes de Petri à ensemercer, pour sa disponibilité et son aide technique et scientifique.

Delphine, pour ses points de vue, ses conseils et son aide.

Ammara et Bastien, « mes collègues de bureau » et amis tout simplement, pour la joie et la spontanéité qui les animent, et pour tous ces moments passés ensemble...

Toute ma famille et tous mes amis qui me sont chers.

Enfin, ce projet de trois ans n'aurait pu aboutir sans votre soutien. Que chacun d'entre vous soit ici de tout cœur remercié d'avoir participé de plus ou moins loin à cette aventure « 69 ».

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre	2
Université Claude Bernard Lyon I	3
Remerciements	4
Table des matières	9
Sommaire	10
Liste des abréviations	18
Liste des illustrations	19
Introduction	26
Mémoire Bibliographique	29
Mémoire Expérimental	123
Discussion & Perspectives	252
Conclusion	263
Annexes	266
Bibliographie	276

SOMMAIRE

Page de titre	2
Université Claude Bernard Lyon I	3
Remerciements	4
Table des matières	9
Sommaire	10
Liste des abréviations	18
Liste des illustrations	19
INTRODUCTION	26
MÉMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE	29
<i>CHAPITRE 1</i> Données générales, bactériologiques, cliniques et épidémiologiques sur <i>Escherichia coli</i> O157:H7 et les <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC)	
1. Taxonomie	30
1.1 Caractères généraux	30
1.2 L'espèce <i>E. coli</i>	31
1.3 Classification des <i>E. coli</i> responsables de gastro-entérites et de diarrhées	32
1.4 Phylogénie des STEC	35
1.4.1 Origine des EHEC	35
1.4.2 Origine du clone O157	35
2. Facteurs de virulence des STEC	37
2.1 Les Shiga-toxines	37
2.1.1 Structure	37
2.1.2 Variants	37
2.1.3 Mécanismes d'action	38

2.2 Les facteurs d'adhésion	39
2.3 Les facteurs plasmidiques	40
2.3.1 L'entérohémolysine	40
2.3.2 Autres facteurs plasmidiques	41
2.4 Autres facteurs	41
3. Epidémiologie environnementale et alimentaire de <i>Escherichia coli</i>	
O157:H7 et des STEC	42
3.1 Portage et excrétion de <i>E. coli</i> O157:H7 et des STEC chez les bovins	42
3.2 Dans l'environnement	44
3.3 Dans les différentes filières agro-alimentaires	45
3.3.1 Filière viandes bovines	45
3.3.2 Filière lait et produits laitiers	47
3.3.3 Filière végétale (légumes et fruits)	48
4. Epidémiologie humaine	50
4.1 Pathologie humaine liée aux STEC	50
4.1.1 Colite hémorragique	50
4.1.2 SHU	51
4.1.3 PTT	52
4.2 Principaux modes de transmission	52
4.2.1 Transmission alimentaire	53
4.2.2 Transmission inter-humaine	53
4.2.3 Transmission par le milieu extérieur	54
4.3 Principales épidémies	54
5. Prévention	56
5.1 Au niveau de l'élevage	56
5.2 Au niveau des industries agro-alimentaires	57
5.2.1 Au niveau des abattoirs	57
5.2.2 Au niveau des ateliers de transformation	58
5.3 Au niveau du consommateur	59

CHAPITRE 2 Modélisation de la croissance bactérienne et physiologie des STEC

1. Modélisation de la cinétique de croissance et paramètres associés.....	61
1.1 Description de la cinétique et des paramètres	61
1.2 Modèles Primaires	62
2. Effets des facteurs environnementaux.....	66
2.1 Modélisation du taux spécifique de croissance maximum	67
2.2 Modélisation du temps de latence	69
2.3 Modélisation du niveau maximum atteint	70
3. Effets de la flore annexe	71
3.1 Modélisation du niveau maximum atteint	71
3.2 Effet de la flore annexe sur les autres paramètres de croissance	74
3.3 Conclusion	75

CHAPITRE 3 Les protocoles de recherche de *Escherichia coli* O157:H7 et des STEC dans les aliments, la matière fécale et l'environnement

1. Echantillonnage.....	76
1.1 Au niveau de l'abattoir.....	76
1.1.1 Carcasses	76
1.1.1.1 Adhésion des bactéries à la surface des carcasses	76
1.1.1.2 Méthodes de prélèvement	77
1.1.1.2.1 Avantages et limites de ces 3 principales méthodes	78
1.1.1.2.2 Performances des méthodes par chiffonnage vs excision.....	80
1.1.1.3 Exemples de protocoles d'échantillonnage sur carcasses de bovins...	82
1.1.2 Autres types de prélèvement	86
1.1.2.1 Surfaces de travail	86

1.1.2.2 Cuir	87
1.1.2.3 Fèces	87
1.2 Au niveau de l'industrie de transformation	88
1.2.1 Minerais	88
1.2.2 Steak haché	89
2. Protocole d'enrichissement	92
2.1. Présentation de la Publication N°1	92
2.2. Résultats et discussion	92
2.3. Eléments complémentaires	93
2.3.1 Masse d'échantillon testée et volume de milieu ajouté	94
2.3.2 Volume de milieu ajouté pour les autres types de prélèvement	94
Publication N°1	95
3. Détection des STEC et de <i>E. coli</i> O157:H7	103
3.1. Méthodes phénotypiques	103
3.1.1 Détection de <i>E. coli</i> O157:H7	103
3.1.1.1 Utilisation des propriétés biochimiques de <i>E. coli</i> O157:H7	103
3.1.1.2 Tests immunologiques de détection de <i>E. coli</i> O157:H7	104
3.1.2 Détection des STEC	112
3.1.2.1 Utilisation de l'effet cytopathogène des Shiga-toxines	112
3.1.2.2 Tests immunologiques de détection des STEC dans l'aliment	112
3.2 Méthodes génétiques de détection des STEC	113
3.2.1 Détection des gènes <i>stx</i>	113
3.2.1.1 Hybridation ADN-ADN et sondes oligonucléotidiques	114
3.2.1.2 PCR	114
3.2.2 Détection des gènes spécifiques du sérotype <i>E. coli</i> O157:H7	116
3.2.2.1 Détection du gène <i>uidA</i>	117
3.2.2.2 Détection du gène <i>eae</i>	117
3.2.2.3 Détection du gène <i>fliC</i>	118
3.2.2.4 Détection du gène <i>rfb</i>	118
3.2.3 Application en industries agro-alimentaires des méthodes génétiques	118
3.3. Limites des méthodes	120
3.4. Nouvelles méthodes et originales de détection des STEC et de <i>E. coli</i> O157	121

MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL.....123

CHAPITRE 1 Modélisation de la croissance en vue d'une
optimisation de la phase d'enrichissement

1. But de ces trois études	125
2. Matériels et méthodes	125
3. Résultats et discussion	127
3.1 Pour l'étude N°1 : Matrice « steak haché »	127
3.2 Pour l'étude N°2 : Matrice « fèces de bovins »	128
3.3 Pour l'étude N°3 : Matrice « lait cru »	129
3.3.1 Ajustement individuel des cinétiques de croissance de O157 et FT	129
3.3.2 Ajustement global des cinétiques de croissance de O157 et FT	130
3.3.3 Impacts des facteurs d'enrichissement sur les paramètres de croissance de O157 et FT	131
3.3.4 Etude complémentaire : suivi de pH durant la phase d'enrichissement ...	134
3.3.5 Conclusion	135
4. Comparaison des résultats obtenus pour les trois études	135
 Publication N°2	137
 Publication N°3	146

CHAPITRE 2 Interférences liées à la présence de substances
antibiotiques dans les milieux d'enrichissement

1. Contexte et but de l'étude	167
2. Matériels et méthodes	167
3. Résultats et discussion	168
 Publication N°4	170

CHAPITRE 3 Optimisation de l'échantillonnage

1. Introduction	180
2. Prélèvement d'échantillons de steak haché	180
2.1 Contexte et but de l'étude	180
2.2 Matériels et méthodes	181
2.3 Résultats et discussion	182
3. Prélèvement d'échantillons sur carcasses de bovins	185
3.1 Contexte et but de l'étude	185
3.2 Matériels et méthodes	187
3.2.1 Sites de prélèvement	187
3.2.2 Matériels utilisés	187
3.2.3 Schéma de prélèvement.....	188
3.2.4 Analyses microbiologiques	189
3.2.5 Analyses statistiques	189
3.3 Résultats	190
3.4 Discussion.....	191
4. Conclusion	194
Publication N°5	195
Communication N°1	218
Résumé de la communication N°1	219

CHAPITRE 4 Projet de création d'une nouvelle méthode de détection de *E. coli* O157:H7

1. Introduction	221
2. Présentation du système TEMPO® (bioMérieux)	221
2.1 Généralités	221
2.2 Principe et protocole d'utilisation : <i>cas du TEMPO EC</i>	222

3. Performance des milieux d'enrichissement.....	224
3.1 Performance en terme de croissance.....	224
3.1.1 Matériels et méthodes.....	224
3.1.2 Résultats.....	224
3.2 Performance en terme d'apparition de la fluorescence	225
3.2.1 Matériels et méthodes.....	225
3.2.2 Résultats.....	225
3.3 Conclusion.....	226
4. Suivi du temps d'apparition de la fluorescence	228
4.1 Rappel théorique.....	228
4.2 Matériels et méthodes	230
4.2.1 Expérimentations.....	230
4.2.2 Analyse des données	231
4.3 Résultats.....	232
4.4 Discussion	234
4.5 Conclusion.....	235
5. Suivi de croissance dans les trois types de puits.....	236
5.1 Matériels et méthodes.....	236
5.1.1 Expérimentations avec une quantité de <i>E. coli</i> O157 différente dans les 3 types de puits	237
5.1.2 Expérimentations avec une quantité de <i>E. coli</i> O157 identique dans les 3 types de puits	238
5.1.3 Analyse des données.....	240
5.2 Résultats.....	240
5.2.1 Expérimentations avec des quantités différentes dans les 3 types de puits	240
5.2.2 Expérimentations avec des quantités identiques dans les 3 types de puits	241
5.3 Conclusion.....	243
6. Conclusion générale.....	243
7. Bilan pour la conception de la carte de détection de <i>E. coli</i> O157:H7.....	246

7.1 Rappel.....	246
7.1.1 Niveaux de contamination.....	246
7.1.2 Effet répartition (ou ratio en présence de microflores annexes) des bactéries dans la carte.....	246
7.1.3 Limites de détection	247
7.2 Choix du type de puits pour la carte de détection de <i>E. coli</i> O157:H7	248
DISCUSSION & PERSPECTIVES	252
CONCLUSION	263
ANNEXES	266
ANNEXE I : Principales étapes du processus infectieux des STEC	267
ANNEXE II : Les lésions d'attachement effacement (A/E).....	268
ANNEXE III : Flux potentiels de STEC.....	269
ANNEXE IV : Répartition géographique des épidémies d'infections à STEC dans le monde avec leurs modes de transmission identifiés	270
ANNEXE V : Appréciation de la « propreté des bovins »	271
ANNEXE VI : Critères d'hygiène pour les carcasses de bovins	272
ANNEXE VII : Chaîne d'abattage de bovins	273
ANNEXE VIII : Barrettes VIDAS ECO.....	274
ANNEXE IX : Schéma de production du steak haché	275
BIBLIOGRAPHIE	276
TITLE AND ABSTRACT	317

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFCM = Analyse Factorielle des Correspondances Multiples

AFNOR = Association Française de NORmalisation

AFSSA = Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

ATB = Antibiotique

DGAL = Direction Générale de l'ALimentation

EC = *E. coli* Broth

EPT = Eau Peptonnée Tamponnée

FT = Flore Totale

HACCP = Hazard Analysis Critical Control Point (Méthode d'analyse de contrôle des points critiques)

IMS = Immunomagnetic separation

ISO = Organisation Internationale de Normalisation

MAMT = Microflore Aérobie Mésophile Totale

MG = Matière Grasse

O157 = *Escherichia coli* O157:H7

RFV = Relative Fluorescence Value

SH = Steak Haché

SHU = Syndrome Hémolytique et Urémique

TSB = Tryptone Soya Broth

UE = Union Européenne

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

- Figure 1** : Pathogénie associée aux six classes de *E. coli* responsables de diarrhées**32**
- Figure 2** : Définition et place des STEC et EHEC au sein des *E. coli***34**
- Figure 3** : Modèle hypothétique de l'émergence de *E. coli* O157:H7 basé sur les mutations dans le gène *uidA*, la production de Shiga-toxine(s), ainsi que les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase.....**36**
- Figure 4** : Mécanisme d'action des Shiga-toxines**38**
- Figure 5** : Paramètres caractéristiques d'une cinétique de croissance d'une population de micro-organismes donnée**62**
- Figure 6** : Ajustement des trois modèles primaires de croissance sur une cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7**65**
- Figure 7** : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec un modèle de type racine carrée**68**
- Figure 8** : Exemple de cinétiques de croissance simultanées de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe du steak haché, ajustées à l'aide du modèle de Buchanan en supposant le paramètre t_{\max} commun.....**73**
- Figure 9** : Sites obligatoires de prélèvement en cas de contamination d'une carcasse de bovin.....**83**

<u>Figure 10</u> : Mode opératoire de l'IMS (ISO EN-16654).....	110
<u>Figure 11</u> : Protocole de recherche de <i>E. coli</i> O157 dans l'aliment : méthode VIDAS ECO	111
<u>Figure 12</u> : Cinétiques de croissance des 2 souches de <i>E. coli</i> O157:H7 (couleur noire) et de la flore totale (couleur rouge), et courbes théoriques obtenues après ajustement à l'aide du modèle 3, pour les 8 protocoles testés.....	131
<u>Figure 13</u> : Graphique représentant les paramètres estimés par le modèle 3 et les intervalles de confiance (95%) associés	133
<u>Figure 14</u> : Diagramme en boîte de la distribution des différences entre l'excision et le chiffonnage pour les 5 types d'éponge.....	191
<u>Figure 15</u> : Protocole expérimental pour le suivi de la fluorescence par puits et l'évaluation de la performance des 2 milieux d'enrichissement.....	226
<u>Figure 16</u> : Cinétiques d'apparition de la fluorescence dans les puits de 2,25 22,5 et 225 µl avec les milieux TEMPO EC et TSB	227
<u>Figure 17</u> : Histogrammes de fréquence des concentrations en <i>E. coli</i> simulées pour chaque type de puits pour une concentration de la suspension dispensée de 700 UFC.ml ⁻¹	229
<u>Figure 18</u> : Histogrammes de fréquence des ratios simulés pour chaque type de puits, pour une suspension initiale avec 700 UFC.ml ⁻¹ de EC et 5000 UFC.ml ⁻¹ de MAMT	230
<u>Figure 19</u> : Médiane des temps de détection calculée sur environ 38 puits positifs pour chaque condition.....	232

<u>Figure 20</u> : Temps d'apparition de la fluorescence des puits positifs pour les 3 ratios et les 3 types de puits étudiés	233
<u>Figure 21</u> : Protocole expérimental du suivi de croissance dans les 3 types de puits	237
<u>Figure 22</u> : Protocole de prélèvement des 3 catégories de puits	238
<u>Figure 23</u> : Protocole expérimental du suivi de croissance dans les 3 types de puits	239
<u>Figure 24</u> : Protocole de prélèvement des 3 catégories de puits	239
<u>Figure 25</u> : Cinétique de croissance de <i>E. coli</i> O157 dans les 3 types de puits.....	241
<u>Figure 26</u> : Cinétique de croissance de <i>E. coli</i> O157 dans les 3 types de puits	242
<u>Figure 27</u> : Projection des cartes en fonction de la sensibilité (limite de détection) et du temps de détection	249
<u>Figure 28</u> : Stratégie de pré-enrichissement	251

Photographies

<u>Photo 1</u> : Méthode de prélèvement non-destructive (chiffonnette)	85
<u>Photo 2</u> : Méthode de prélèvement non-destructive (éponge abrasive)	85
<u>Photo 3</u> : Méthode de prélèvement destructive (excision).....	86
<u>Photo 4</u> : Exemple de kit de prélèvement pour l'échantillonnage de surfaces.....	86
<u>Photo 5</u> : VIP test, test immunologique en « 1 étape »	107

<u>Photo 6</u> : Kit BAX-Qualicon	119
<u>Photo 7</u> : Kit Probelia –BioRad	119
<u>Photo 8</u> : Sites de prélèvement sur quartiers avant (QA) et carcasses chaudes (CC)	187
<u>Photo 9</u> : Aperçu des cinq types d'éponge (l'éponge EAC, étant la combinaison de l'éponge EA et de la chiffonnette ES) utilisés pour les prélèvements par méthode non-destructive	188
<u>Photo 10</u> : Poste de préparation (TEMPO Filler) et poste de lecture (TEMPO Reader)	222
<u>Photo 11</u> : Principe et protocole de réalisation du test TEMPO EC (bioMérieux, Marcy, France)	223

Tableaux

<u>Tableau I</u> : Principaux critères différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i>)	31
<u>Tableau II</u> : Prévalence du portage des STEC chez les bovins (en % d'animaux atteints parmi les animaux testés)	43
<u>Tableau III</u> : Fréquences observées de produits contaminés par des STEC	46
<u>Tableau IV</u> : Fréquences observées de produits contaminés par <i>E. coli</i> O157:H7	46
<u>Tableau V</u> : Fréquences de carcasses de bovins contaminées par <i>E. coli</i> O157:H7 et niveaux de contamination	47

<u>Tableau VI</u> : Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC	48
<u>Tableau VII</u> : Exemples d'infections à STEC, classés en fonction du type d'aliment incriminé.....	55
<u>Tableau VIII</u> : Estimation des paramètres caractéristiques de la croissance par ajustement des modèles de Gompertz modifié, Baranyi et Buchanan à une cinétique de croissance d'une souche de <i>E. coli</i> O157:H7.....	66
<u>Tableau IX</u> : Avantages et limites des trois méthodes de prélèvement les plus utilisées	78
<u>Tableau X</u> : Enumération (\log_{10} UFC/cm ²) de microorganismes sur la surface de carcasses de bovins échantillonnées à l'aide de méthodes destructive et non-destructive	81
<u>Tableau XI</u> : 25 demi-carcasses de bovins ont été échantillonnées par un tampon de gaze sur une surface de 10, 100 ou 1000 cm ² . Le tableau ci-dessous reporte le nombre d'échantillons pour lesquels aucun coliforme ou <i>E. coli</i> n'a été détecté (Echantillons Négatifs)	82
<u>Tableau XII</u> : Probabilité de détecter <i>E. coli</i> O157:H7 dans un hachoir en fonction de la prise d'essai réalisée	90
<u>Tableau XIII</u> : Kits immunologiques de détection de <i>E. coli</i> O157:H7 dans l'aliment	105

<u>Tableau.XIV</u> : Valeurs (heures) de $t_{\max FT}$ et $t_{\max O157}$, et de la différence entre $t_{\max O157}$ et $t_{\max FT}$	130
<u>Tableau.XV</u> : Valeurs (\log_{10} UFC.ml ⁻¹) de $y_{\max O157}$ obtenues pour les 8 protocoles étudiés et pour chacune des souches de O157 testées.....	133
<u>Tableau XVI</u> : Plan d'expérience réalisé pour évaluer les performances de l'éponge BIOTRACE par rapport à l'excision.....	189
<u>Tableau XVII</u> : Taux de récupération moyen (\log_{10} UFC/cm ²) obtenu pour les cinq types d'éponge et moyenne des différences observées entre l'excision et chaque type d'éponge	190
<u>Tableau XVIII</u> : Plan d'expérience	230
<u>Tableau XIX</u> : Protocole expérimental détaillé	231
<u>Tableau XX</u> : Temps d'apparition (heures) des premiers positifs dans chaque catégorie de puits et pour les différents ratios testés.....	234
<u>Tableau XXI</u> : Concentration en <i>E. coli</i> O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 2,25 µl flashent.....	243
<u>Tableau XXII</u> : Concentration en <i>E. coli</i> O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 22,5 µl flashent.....	244
<u>Tableau XXIII</u> : Concentration en <i>E. coli</i> O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 225 µl flashent.....	244

<u>Tableau XXIV</u> : Niveaux de contamination en MAMT et <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC.g ⁻¹)	246
<u>Tableau XXV</u> : Caractéristiques relatives aux 4 cartes imaginées.....	247
<u>Tableau XXVI</u> : Limites de détection en UFC.ml ⁻¹	247
<u>Tableau XXVII</u> : Temps de détection des 3 cartes en fonction de la concentration initiale.....	248
<u>Tableau XXVIII</u> : Classement des cartes en fonction de la sensibilité	248
<u>Tableau XXIX</u> : Classement des cartes en fonction de la rapidité de détection	249
<u>Tableau XXX</u> : Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une m \acute{e} lée \grave{a} partir de l'analyse de 30 \acute{e} chantillons de 25 grammes chacun	260
<u>Tableau XXXI</u> : Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une m \acute{e} lée \grave{a} partir de l'analyse de 10 \acute{e} chantillons de 75 grammes chacun	260
<u>Tableau XXXII</u> : Calcul, pour diverses concentrations C dans la m \acute{e} lée et diverses valeurs possibles de k , de la probabilité que le nombre X d' \acute{e} chantillons positifs parmi 10 \acute{e} chantillons de 75 grammes soit inf \acute{e} rieur ou \acute{e} gal \grave{a} k	261



INTRODUCTION...



A

A l'heure actuelle, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ou VTEC selon l'ancienne dénomination) sont considérés comme des pathogènes émergents importants en santé publique, notamment en raison des faibles doses infectieuses observées. Depuis 1982, ils ont été à l'origine de nombreux cas d'infections humaines à travers le monde, essentiellement consécutives à la consommation d'aliments contaminés (e.g. viande hachée, lait et fromages au lait cru, légumes...) par des STEC. La France n'est en l'occurrence pas en reste, avec l'apparition encore récemment de deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) importantes : une première en octobre 2005, liée à *E. coli* O157:H7 incriminant de la viande hachée de bœuf (Mailles et al., 2006), et une seconde en décembre 2005, due à la consommation de fromages au lait cru contaminés par *E. coli* O26 (Espié et al., 2006).

Il existe néanmoins d'autres modes de transmission des infections à STEC à l'homme, comme la transmission inter-humaine, le contact avec des animaux porteurs sains, ou bien encore le contact avec des éléments du milieu extérieur souillés par des fèces (e.g. eaux de baignade, sols...).

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) parfois mortel, particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou d'un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte.

Les STEC et plus particulièrement le sérotype O157:H7 représentent donc un danger pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agro-alimentaires. Or, en dépit des différents éléments soulignés dans les lignes précédentes, il n'existe à l'heure actuelle aucune réglementation officielle stipulant les procédures à suivre pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans les denrées alimentaires. Ainsi, les divers protocoles de recherche utilisés actuellement dans les industries et les laboratoires de diagnostics varient principalement, d'une part, en fonction des procédures d'échantillonnage mises en place dans ces structures et, d'autre part, en fonction des protocoles d'enrichissement et méthodes de détection employés.

Il se pose alors la question de savoir si les principaux protocoles en vigueur permettent d'ores et déjà de détecter de façon fiable le pathogène ; ou bien si ceux-ci nécessitent une

optimisation afin de garantir une réelle sécurité des denrées commercialisées vis-à-vis des STEC.

Il paraissait donc important de disposer d'éléments de réponse concrets par rapport à cette interrogation, de manière à pouvoir proposer ensuite aux industriels des recommandations pertinentes de maîtrise de ce danger.

Avant d'exposer les résultats de notre étude, objet du mémoire expérimental, il convient de replacer ce travail dans son contexte scientifique général, développé dans le mémoire bibliographique.

La synthèse bibliographique est successivement consacrée à des rappels généraux sur *E. coli* O157:H7 et les STEC non-O157:H7, puis à la modélisation de la croissance bactérienne et à la physiologie des STEC ; deux parties requises pour mieux comprendre la troisième et dernière partie concernant les protocoles de recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC-non O157:H7 dans les aliments et l'environnement.

L'étude expérimentale reprend l'ensemble des travaux qui ont été entrepris afin d'optimiser la recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 dans les denrées alimentaires et les matrices environnementales. Les étapes de notre étude sont les suivantes :

- ↓ Optimiser l'étape d'enrichissement en appréciant les effets de différents facteurs d'enrichissement et de la flore annexe de trois matrices (i.e. steak haché, lait cru et fèces de bovins), sur la croissance de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 ;
- ↓ Etudier les interférences liées à la présence de substances antibiotiques dans les milieux d'enrichissement, dans le but d'en évaluer les conséquences sur la détection des STEC ;
- ↓ Optimiser l'étape d'échantillonnage au niveau des abattoirs et des industries de transformation, afin de permettre aux industriels d'assurer une meilleure innocuité de leur produit ;
- ↓ Mettre au point en collaboration avec le département R&D de bioMérieux Industry, un kit de détection rapide et de dénombrement de *E. coli* O157:H7.

Les résultats expérimentaux sont exposés sous la forme de cinq publications (dont quatre acceptées et une en cours de soumission, dans des revues internationales) et d'une communication affichée et présentée lors d'un congrès international.



MÉMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE...



Données générales, bactériologiques, cliniques et épidémiologiques sur *Escherichia coli* O157:H7 et les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC)

1. Taxonomie

1.1 Caractères généraux

C'est en 1885 que la bactérie *Escherichia coli* est décrite pour la première fois dans des selles de nourrissons, par l'Allemand Theodor Escherich. Toutefois, son nom actuel lui est donné en 1919 par Castellani et Chambers (Grimont, 1987).

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, qui doit son nom à leur isolement fréquent du tube digestif et/ou des fèces des mammifères (Greatorex et Thorne, 1994). Les genres constituant cette famille sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor et al., 1990). A noter que les genres *Salmonella* et *Shigella* appartiennent également à cette famille.

Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. Il s'avère important de souligner que les membres d'une même espèce présentent habituellement plus de 70% d'homologie génomique alors qu'entre espèces différentes, l'homologie est inférieure à 60%. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant ainsi de les différencier (Tableau I).

Caractéristiques	<i>E. coli</i> non O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. hermanii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Indole	+	+	+	-	+
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
β -xylosidase	-	-	-	+	-
β -glucuronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+

(+), positif avec la majorité des souches ; +/-, positif ou négatif selon les souches; LDC, Lysine Décarboxylase ; ODC, Ornithine Décarboxylase

Tableau I : Principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*) (d'après Grimont, 1987).

1.2 L'espèce *E. coli*

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore bactérienne du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de nombreux animaux à sang chaud. Il représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988). A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (e.g. *Salmonella thyphimurium*, *E. coli* O157:H7...).

En outre, bien que la majorité des souches de *E. coli* soient commensales banales, certaines d'entre elles sont pathogènes et connues des médecins comme étant à l'origine de pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl, 1993). Les principaux pathotypes intestinaux, décrits en fonction des facteurs de pathogénicité et des signes cliniques engendrés, seront abordés dans le paragraphe suivant.

1.3 Classification des *E. coli* responsables de gastro-entérites et de diarrhées

Il est important de rappeler qu'il n'existe pas de classification standardisée. En effet comme évoqué précédemment, les médecins utilisent une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes (Figure 1) :

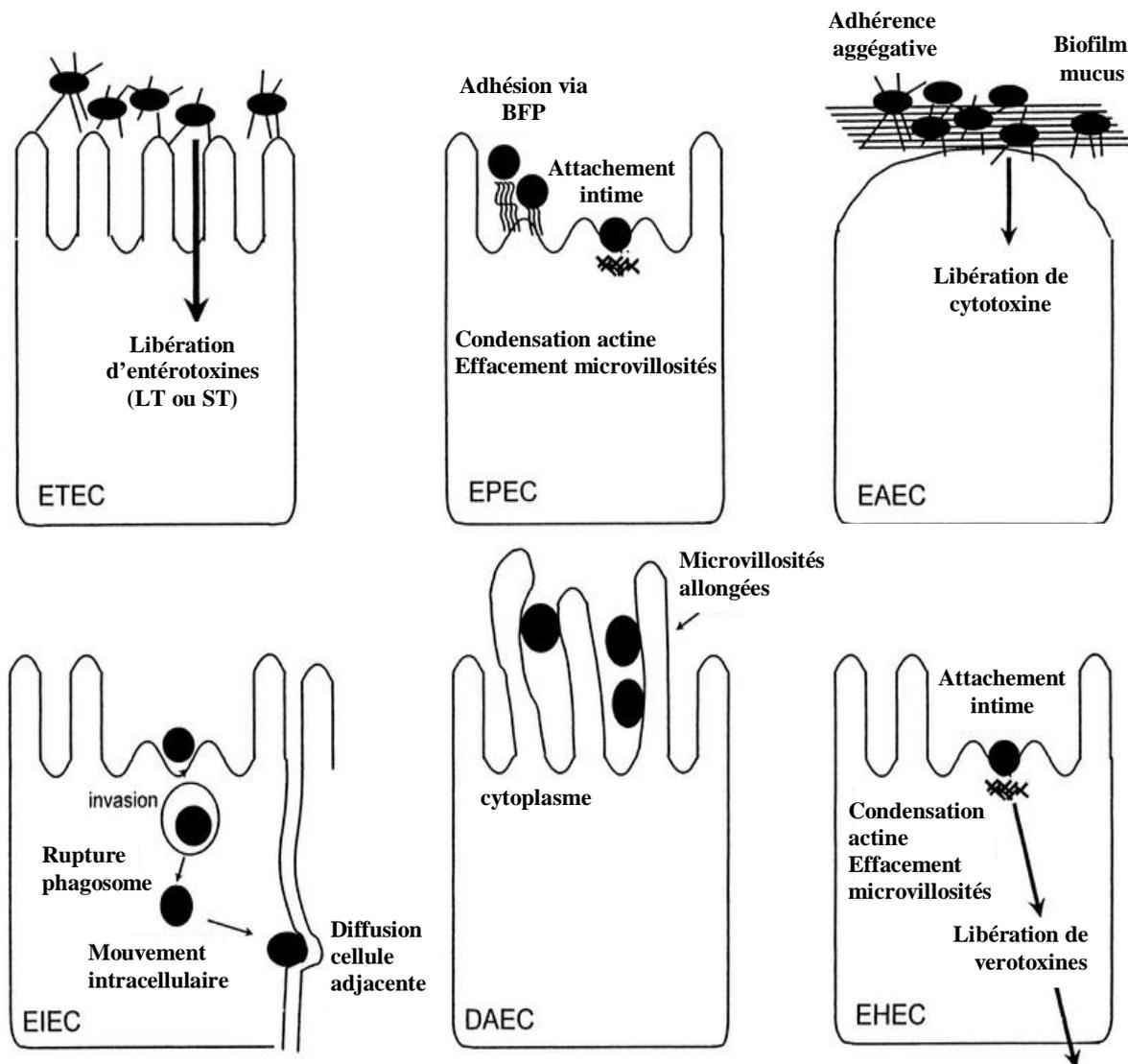


Figure 1 : Pathogénie associée aux six classes de *E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998).

✓ **Les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC)** majoritairement associés à 2 syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la « fameuse » diarrhée du voyageur. Les ETEC sont définis comme des souches possédant au moins une toxine appartenant soit au groupe des entérotoxines thermostables (ST), soit au groupe des entérotoxines thermolabiles (LT) (Levine, 1987). Ils possèdent également d'autres facteurs de virulence leur permettant de coloniser la muqueuse intestinale (Cassels et Wolf, 1995) ;

✓ **Les *E. coli* Entéro-pathogènes (EPEC)** sont responsables de diarrhées infantiles. Lors d'infections apparaissent des lésions histopathologiques particulières, appelées lésions d'attachement et effacement (lésions A/E) (Andrade et al., 1989). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions (Jerse et al., 1990) ;

✓ **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)** présentent un phénotype d'adhésion aux cellules Hep-2 proche de celui des EPEC mais toutefois différent puisqu'il s'agit d'une adhérence non pas localisée mais diffuse (Vial et al., 1988). En revanche, ces souches ne produisent aucune entérotoxine ;

✓ **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)** sont biochimiquement et génétiquement assez proches de *Shigella spp* (Brenner et al., 1973), tout comme leur pathogénie (invasion de l'épithélium intestinal) ;

✓ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture (Benz et Schmidt, 1992 ; Cookson et Nataro, 1996).

✓ **Les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC)** sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley et al., 1983). Les EHEC, qui sont des souches isolées chez les malades, possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx*₁ codant pour la Shiga-toxine 1 [Stx1] ou *stx*₂ codant pour la Shiga-toxine 2 [Stx2]) (Konowalchuk et al., 1977 ; O'Brien et al., 1980) ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* (Levine et Eldman, 1984). L'ensemble des souches d'*Escherichia coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC selon l'ancienne dénomination

internationale [verotoxin-producing *E. coli*]). Il est important de souligner qu'en dépit du fait que les STEC soient qualifiés de pathogènes émergents, tous ne sont néanmoins pas pathogènes pour l'homme (Figure 2).

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

- ❶ du séroroupe, identifié par rapport aux antigènes somatiques O. Plus de 180 sérogroupes O de *E. coli* sont actuellement connus ;
- ❷ du sérotype, identifié au sein du séroroupe par rapport aux antigènes d'autres structures présentes à la surface des bactéries. Il s'agit essentiellement des antigènes H du flagelle (56 antigènes différents) et éventuellement des antigènes K de la capsule (80 antigènes).

Cette classification permet d'obtenir, en considérant les trois antigènes O, H et K, plus de 800 000 sérotypes différents. Cependant seulement 2000 sérotypes environ, ont été réellement isolés à ce jour. Parmi ceux-ci, *E. coli* O157:H7 est le principal sérotype responsable de pathologie chez l'homme. Les nombreuses épidémies survenues depuis les années 1980 (e.g. 1996 au Japon : 9451 malades et 12 décès recensés suite à la consommation de radis blancs contaminés) étaient consécutives à la consommation de denrées alimentaires contaminées par *E. coli* O157:H7. Néanmoins, d'autres sérotypes (i.e. O26, O111, O145, O103 et O148) sont à l'origine d'épidémies et impliqués dans des SHU à l'échelon international. Les différentes épidémies survenues dans le monde depuis le début des années 1980, sont abordées dans la Partie 4 (Epidémiologie humaine).

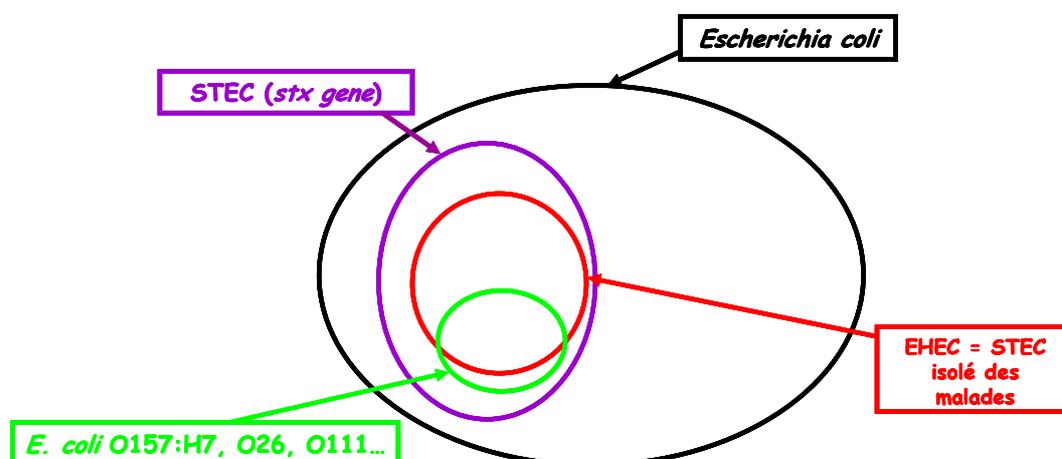


Figure 2 : Définition et place des STEC et EHEC au sein des *E. coli*.

1.4 Phylogénie des STEC

1.4.1 Origine des EHEC

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* Entéropathogènes (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 à son tour pathogène.

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 *stx1* et *stx2* 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.

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).

1.4.2 Origine du clone O157

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par Feng et al. (1998). Celui-ci est 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 3). 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 *stx2* vraisemblablement par transduction avec des phages ; il en résulte l'émergence d'un clone O55:H7 *stx2*-positif puis plus tard l'acquisition d'un plasmide 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 (*stx1*). 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).

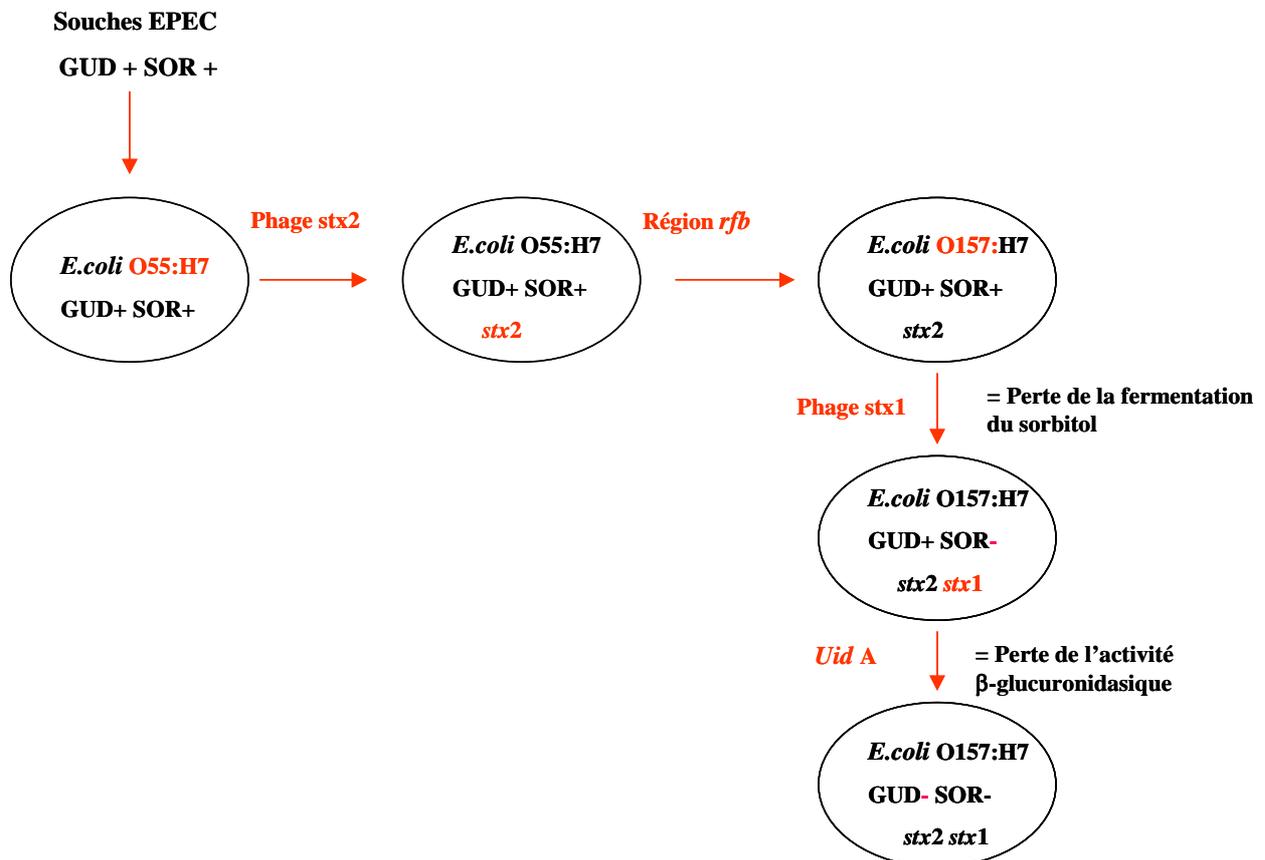


Figure 3 : Modèle hypothétique de l'émergence de *E. coli* O157:H7 basé sur les mutations dans le gène *uidA*, la production de Shiga-toxine(s), ainsi que les phénotypes : acidification du sorbitol et production de β -glucuronidase (Feng et al., 1998).

2. Facteurs de virulence des 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 liés à l'hôte (Paton et Paton, 1998). Les étapes essentielles de ce processus sont illustrées en ANNEXE I et les principaux facteurs de virulence font l'objet des lignes qui suivent.

2.1 Les Shiga-toxines

Les souches de STEC sont caractérisées par leur capacité à produire une ou plusieurs cytotoxines capables de tuer *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines, qui étaient dénommées auparavant verotoxines en raison de leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules Vero, sont actuellement regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (SLT), étant donné leurs homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien et al., 1982; Strockbine et al., 1988).

2.1.1 Structure

Ce sont des hétéropolymères de 70kDa constitués d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase qui entraîne un arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée. Les deux sous-unités sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type λ -like. L'opéron de chaque gène *stx* est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B. Les gènes de la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, ressemblant par leurs structures et leurs fonctions à Stx1, sont situés, quant à eux, sur le chromosome (Gannon et al., 1990).

2.1.2 Variants

On considère deux grandes classes de Shiga-toxines : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Calderwood et al., 1996; Strockbine et al., 1986). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'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). En outre des études (Lindgren et al., 1993; Wadolowski et al., 1990b) ont montré que Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Dans la classe des toxines Stx2, cinq variants sont à l'heure actuelle différenciés : 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 (Fremaux et al., 2007b).

2.1.3 Mécanismes d'action

Dans une première étape, il y a fixation à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- 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), ce qui conduit à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort cellulaire.

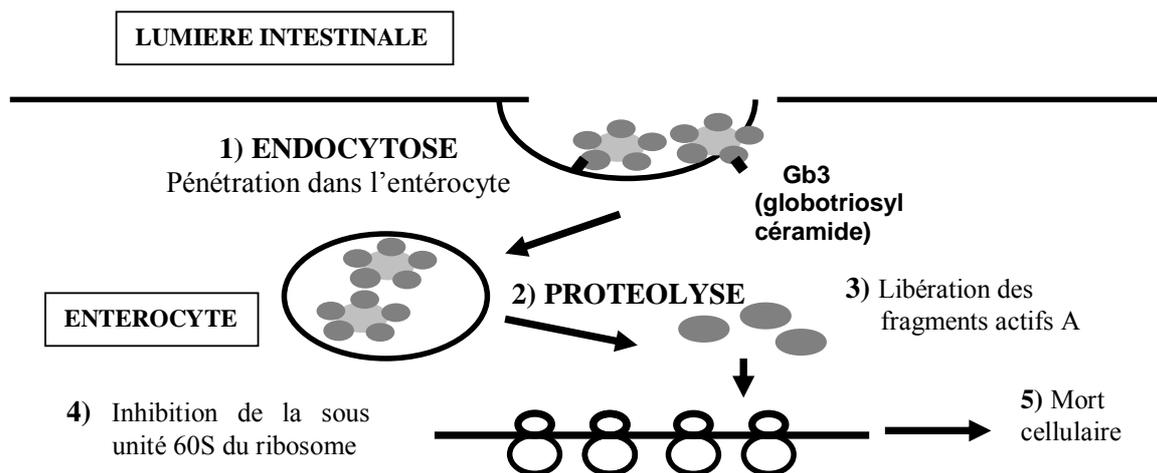


Figure 4 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Extrait de Vernozzy-Rozand et Montet, 2001).

2.2 Les facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénicité. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de membrane externe et des lipopolysaccharides. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de connaître les différents facteurs responsables de ce processus (Paton et al., 1997).

A l'instar des EPEC, des études ont montré que certains STEC ont la capacité de causer des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) (Donnenberg et al., 1993). Elles se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Cet effacement est dû à une dépolymérisation des filaments d'actine constitutifs des microvillosités (Ismaili et al., 1995). Il s'en suit une accumulation et une repolymérisation d'actine pour former un piédestal sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon étroite (cf. ANNEXE II). Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections. Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, l'adhésion des STEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips et Frankel, 2000).

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (Locus of Enterocyte Effacement), 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. 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 et Kaper, 1996).

A noter que dans un souci de concision et d'objectivité, les éléments concernant, d'une part, la régulation de l'expression des gènes du LEE et, d'autre part, les autres facteurs d'adhésion observés, ne seront pas abordés ici.

2.3 Les facteurs plasmidiques

Des facteurs de virulence potentiels ont été décrits sur le plasmide pO157 chez des STEC appartenant au sérotype O157:H7.

2.3.1 L'entérohémolysine

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).

Le rôle de l'entérohémolysine dans la pathogénicité des STEC 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 et 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.

2.3.2 Autres facteurs plasmidiques

Une sérine protéase EspP capable de cliver le facteur V de coagulation humain et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité (Brunder et al., 1997). 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 (Brunder et al., 1996; Burland et al., 1998).

2.4 Autres facteurs

Le gène *astA* codant l'entérotoxine EAST1 a été mis en évidence chez plusieurs souches de STEC (Iyoda et al., 2000, Morabito et al., 1998 ; Savarino et al., 1996). Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

La survie des bactéries dans les aliments et au niveau de l'estomac correspond à une étape importante du processus infectieux. L'étude de souches de sérotype O157:H7 a montré leur capacité à survivre dans des aliments acides tels que la mayonnaise, le jus de pomme, la viande (Abdul-Raouf et al., 1993 ; Glass et al., 1992 ; Zhao et al., 1993). Plusieurs mécanismes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence chez *E. coli* O157:H7 : un système oxydatif, un système arginine-dépendant et un système glutamate-dépendant (Choi et al., 2000 ; Lin et al., 1996 ; Price et al., 2000). Des études ont montré que la résistance aux conditions acides, mais également à la chaleur et à la salinité, dépendait entre autres du régulateur général de réponse au stress codé par le gène *rpoS* (Cheville et al., 1996 ; Price et al., 2000).

3. Epidémiologie environnementale et alimentaire de *Escherichia coli* O157:H7 et des STEC

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

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

3.1 Portage et excrétion de Escherichia coli O157:H7 et des STEC chez les bovins

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

Le tableau II présente quelques données de prévalence du portage des STEC (après recherche des gènes *stx* dans les matières fécales) chez les bovins laitiers et/ou viande de différents pays. Pour chacune des 7 études reportées dans le tableau II, la prévalence du portage des STEC a été calculée à partir du nombre d'animaux atteints dans l'élevage ou les élevages investigués.

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

STEC	Pays	Type de bovins	Prévalence	Référence
	Etats-Unis	Bovins à l'herbe	4% (été) à 15% (hiver)	Thran et al., 2001
	Brésil	Bovins laitiers	82%	Cerqueira et al., 1999
		Bovins à viande	53%	
	Australie	Bovins laitiers	16,7%	Cobbold et Desmarchelier, 2001
	Japon	Veaux	46%	Kobayashi et al., 2001
		Génisses	66%	
		Vaches	69%	
Inde	Bovins Viande	10,5%	Pal et al., 1999	
Ouganda	Zébus	28,3%	Kaddu-Mulindw et al., 2001	
Allemagne	Bovins	63,2%	Beutin et al., 1997	

Tableau II : Prévalence du portage des STEC chez les bovins (en % d'animaux atteints parmi les animaux testés).

Concernant le sérotype *E. coli* O157:H7, Meyer-Broseta et al. (2001) ont réalisé la synthèse de 26 études épidémiologiques effectuées aux Etats-Unis et en Europe. Pour les Etats-Unis, la prévalence en terme de troupeaux atteints oscillait de 0-2 % jusqu'à 22 %, avec une moyenne de 7 à 8 % pour les troupeaux laitiers. Une seule enquête concernait des troupeaux à viande dans laquelle 4 des 25 cheptels étudiés se sont révélés positifs. Les études réalisées en feedlots (ou « factory farming », i.e. concept ou système d'élevage industriel développé essentiellement en Amérique du nord pour l'engraissement des animaux) présentent des valeurs de prévalence beaucoup plus élevées (61% des troupeaux testés se sont révélés positifs). En Europe, les valeurs notées pour la prévalence de *E coli* O157:H7 sont beaucoup plus faibles, entre 0 et 3 % des troupeaux étudiés étaient positifs (Meyer-Broseta et al., 2001).

En outre la synthèse de Meyer-Broseta et al. (2001) révèle qu'aux Etats-Unis, la prévalence de *E. coli* O157:H7 en terme d'animaux atteints est de moins de 1,5 % sur des bovins de moins de 8 semaines (âge du sevrage). Entre 8 semaines et 4 mois, elle augmente de 1,8 à 5 %. La prévalence décroît ensuite avec l'âge, comme cela a été montré par une étude sur des génisses âgées de 4 à 24 mois grâce à des prélèvements mensuels montrant une prévalence moyenne de 2,3 %. Les bovins adultes laitiers ou à viande excrètent *E. coli* O157:H7 avec une plus faible fréquence, inférieure à 0,7 %.

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

3.2 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.

En effet, l'épandage de fumiers ou de lisiers (à des fins de fertilisation des sols) peut être un vecteur important de contamination du sol, des cultures et des eaux (profondes ou de surface) et ainsi présenter un risque potentiel de contamination de l'animal et de l'homme (cf. ANNEXE III). En outre, les STEC semblent pouvoir survivre et conserver leur capacité de virulence (production de Stx1 et/ou Stx2) après survie pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (abreuvoir, fumier et lisier) (Wang et al., 1996 ; Fremaux et al., 2007a), dans les sols (Fenlon et al., 2000) et dans les eaux (Wang et Doyle, 1998). Cette réelle capacité de survie augmente le pouvoir de virulence des STEC comme en témoignent les deux exemples cités ci-dessous.

Le premier concerne une infection par *E. coli* O157:H7 survenue aux Etats-Unis chez un patient végétarien consommant les produits de son jardin, régulièrement fertilisé avec du fumier de bovins présentant une sérologie positive pour *E. coli* O157:H7 (Cieslak et al., 1993). Le deuxième exemple fait état d'un essai de modélisation (Ogden et al., 2002; Strachan et al., 2001) 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 pâture, 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 avait été estimé à 16 ± 2 jours. La quantité de sol ingérée par les enfants avait été estimée entre 30 et 200 mg/24 heures. Trois semaines après l'épisode décrit chez les scouts, *E. coli* O157:H7 était retrouvé dans 100 % des prélèvements de fèces d'animaux analysés et 60 % des prélèvements

de sol, à des taux allant de 3 à 10^3 UFC.g⁻¹ pour les fèces et de l'ordre de 3 UFC.g⁻¹ pour le sol.

3.3 Dans les différentes filières agro-alimentaires

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

3.3.1 Filière viande bovine

De nombreuses épidémies d'infection à *E. coli* O157:H7 ont été associées à la consommation de viande de bœuf ou de préparations à base de viande de bœuf et notamment récemment en France avec l'épidémie survenue dans le sud-ouest en octobre 2005.

Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer le mode de contamination des denrées alimentaires. Les études menées au niveau de la filière viande ont eu pour but de mettre en évidence le lien entre le portage au niveau fécal et la contamination des carcasses puis des viandes et produits à base de viande commercialisés.

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

Les tableaux III et IV présentent respectivement, pour différents pays, quelques fréquences observées de produits contaminés (viande de bœuf cru et steak haché) par des STEC et *E. coli* O157:H7.

	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Référence
STEC	Thaïlande	Bœuf cru	93	8,6	Suthienkul et al., 1990
	Canada	Bœuf cru	225	36	Read et al., 1990
	Royaume Uni	Bœuf haché cru	134	13	Willshaw et al., 1993
		Saucisse de bœuf crue	52	17	
		Beef burger cru	124	22	
	Etats-Unis	Bœuf cru	60	23	Samadpour et al., 1994
Veau cru		8	63		
France	Bœuf cru	411	11	Pradel et al., 2000	

* Nombre de produits testés

Tableau III : Fréquences observées de produits contaminés par des STEC.

	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Référence
<i>E. coli</i> O157:H7	Etats-Unis	Bœuf cru	164	3,7	Doyle et Schoeni, 1987
	Canada	Bœuf cru	165	2,4	Sekla et al., 1990
	Etats-Unis	Bœuf cru	107	2,8	Padhye et Doyle, 1991
	Etats-Unis	Bœuf cru	1668	0,1	Griffin et Tauxe, 1991
		Foie de veau cru	4953	0,2	
	Etats-Unis	Bœuf cru	1400	0	Tarr et al., 1999
	Hollande	Bœuf cru	1469	0,4	Heuvelink et al., 1999
		Steak haché	147	0,7	
France	Bœuf cru haché	3500	0,1	Vernozy-Rozand et al., 2002	
Royaume Uni	Steak haché	ND [†]	0,44	Chapman et al., 1992	

* Nombre de produits testés ; [†] Non Déterminé

Tableau IV : Fréquences observées de produits contaminés par *E. coli* O157:H7.

Il est également fait état de la fréquence observée de carcasses de bovins contaminées en surface par *E. coli* O157:H7, ainsi que du niveau de contamination de ces carcasses par le pathogène (Tableau V).

Etat des carcasses	Méthode d'échantillonnage	n _{total}	Fréquence (%)	Niveaux moyens de contamination (UFC/100cm ²)	Pays	Référence
Av. Ev.	Chiffonnage (100cm ²)	576	14,7	<1,5	US	Arthur et al., 2004
Ap. Tr.			0,3	<1,5		
Av. Ev.	Chiffonnage	1232	27	17*	US	Barkocy et al., 2003
Ap. Tr.			1	<1		
Av. Ev.	Chiffonnage (8000 cm ²)	149	23	ND [†]	US	Bosilevac et al., 2004
Av. Ev.	Chiffonnage (8000 cm ²)	240	50	ND	US	Nou et al., 2003
-	Excision (100 cm ²)	1500	1,4	ND	UK	Chapman et al., 2001
Ap. Saig.	Chiffonnage (400cm ²)	100	12	ND	Italie	Bonardi et al., 2001
Av. Réf.	Excision (4 x 5cm ²)	132	4	7,5 UFC.g ⁻¹	Irlande du nord	Carney et al., 2006
Av. Réf.	Chiffonnage (300cm ²)	100	6	<10	Australie	Fegan et al., 2005
Ap. Réf.			0	ND		
Ap. Réf.	Chiffonnage (300cm ²)	670	0,1	ND	Australie	Phillips et al., 2001
Av. Réf.	Chiffonnage	330	3,6	ND	Turquie	Gun et al., 2003
Av. Réf.	Excision (225cm ²)	255	0,4	ND	France	Guyon et al., 2001

* avec une médiane de 1,1 UFC/100 cm²

[†] Non Déterminé

Av. Ev., Avant Éviscération; Ap. Tr., Après Traitement des carcasses; Ap. Saig., Après Saignée de l'animal; Av. Réf., Avant Réfrigération ; Ap. Réf., Après réfrigération.

Tableau V : Fréquences de carcasses de bovins contaminées par *E. coli* O157:H7 et niveaux de contamination.

3.3.2 Filière lait et produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde depuis plusieurs années. La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite, même si certaines études suggèrent l'existence possible d'une voie de contamination du lait avant la traite (Matthews et al., 1997).

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou des autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles, étant donné la difficulté (due au facteur de dilution) de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de

mélange. Le Tableau VI fait état de quelques fréquences observées en Europe, de laits et produits laitiers contaminés par des STEC.

STEC	Pays	Aliment	n*	Fréquence (%)	Méthode utilisée	Référence
	France	Lait cru	205	21,5	PCR-ELISA	Fach et al., 2001
		Fromages au lait cru	180	30,5		
		Fromages au lait pasteurisé	45	8,9		
	France	Fromages au lait cru	1039	13	PCR	Vernozy-Rozand et al., 2002
	Allemagne	Lait cru et lait certifié	273	3,9 et 2,1	VT-ELISA	Klie et al., 1997
	Hollande	Lait cru	1011	0	IMS	Heuvelink et al., 1998
Angleterre	Lait cru	500	0	IMS	Coia et al., 2001	
	Fromages au lait cru	739	0			
Italie	Lait cru	100	0	EHEC-ELISA test	Massa et al., 1999	

* Nombre de produits testés

Tableau VI : Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC.

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

3.3.3 Filière végétale (légumes et fruits)

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination de l'homme par les STEC et en particulier par *E. coli* O157:H7. Différents végétaux ont été mis en cause comme, par exemple, de la laitue (Ackers et al., 1998; Hilborn et al., 1999), des pommes de terre (Morgan et al., 1988) ou encore des pousses de radis blanc (Taormina et al., 1999). Les causes de contamination des cultures maraîchères mises en avant

sont, le plus souvent, l'irrigation de ces cultures par de l'eau elle-même contaminée et l'épandage d'effluents d'élevage contaminés par les STEC.

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

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

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

A noter que les différences de prévalence de *E. coli* O157:H7 et des STEC qui existent entre les pays sont certes dues au lieu même de l'investigation, mais peuvent également être liées aux méthodes d'échantillonnage et de détection utilisées (cf. Chapitre 3 de ce mémoire bibliographique).

4. Epidémiologie humaine

Toute personne est potentiellement à risque et peut développer une diarrhée, voire un SHU par la suite (e.g. lors de l'épidémie survenue dans le sud-ouest en octobre 2005 suite à la consommation de steak haché contaminé par *E. coli* O157:H7, une personne de 42 ans, sans antécédent pathologique avéré, a été infectée). Néanmoins, les jeunes de moins de 15 ans (et surtout les jeunes enfants <5 ans), les personnes âgées (>65ans) et les personnes ayant pris récemment un traitement antibiotique sont plus susceptibles de développer une microangiopathie thrombotique (e.g. SHU, PTT) (Griffin et al., 1990). D'autres personnes peuvent être considérées à risque du fait de leur exposition fréquente à un réservoir animal de STEC, au travers de leurs activités professionnelles (i.e. éleveurs...) ou de loisirs (enfants en classe verte, ferme pédagogique...).

En France, les infections à STEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. Leur surveillance est basée sur celle 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 (InVS). L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est proche de celles observées dans d'autres pays européens et s'échelonne à moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans.

4.1 Pathologie humaine liée aux 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 et Tauxe, 1991; Tarr, 1995). Ces différentes entités cliniques seront présentées brièvement dans les lignes qui suivent.

4.1.1 Colite hémorragique

Principale manifestation clinique de l'infection à *Escherichia coli* O157:H7 (Griffin et 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 et Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est retrouvée dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). Des nausées, des vomissements, des céphalées et des frissons ont également été rapportés, mais leur fréquence est plus faible.

La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (Griffin et Tauxe, 1991; Sharp et al., 1994). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

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

4.1.2 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 développent 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 et 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. 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).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Loirat et al., 1992; Siegler, 1994). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre cette enquête française dans laquelle 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996, sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central. (Decludt et al., 2000).

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. Toutefois, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet de maintenir actuellement un taux de mortalité inférieur à 5%. Les apports hydro-électrolytiques (par voie orale ou entérale) 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 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. Enfin lorsque l'enfant est anurique, une dialyse est indiquée pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volémique.

4.1.3 PTT

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 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 essentiellement 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).

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.

Le traitement s'est progressivement 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.

4.2 Principaux modes de transmission

Les 3 voies principales d'infection à STEC sont l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminée, la transmission inter-humaine et le contact avec les animaux. Aux Etats-Unis, ces différents modes de transmission représentent respectivement 78%, 20% et 2% (Griffin et al., 2000).

4.2.1 Transmission alimentaire

La majorité des infections est le résultat d'une transmission alimentaire. En effet, un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié épidémiologiquement à la consommation de denrées animales (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts et al., 1995). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mis en cause (Martin et al., 1994 ; Orskov et al., 1987 ; Griffin et Tauxe, 1991 ; Doyle, 1991 ; Paton et al., 1996). De même, des produits végétaux contaminés et des produits laitiers ont été à l'origine d'épidémies (Morgan et al., 1993 ; Cieslak et al., 1993 ; Ackers et al., 1998 ; Miller et Kaspar, 1994).

Pour certains aliments, l'hypothèse d'une contamination croisée avec de la viande de bœuf ou par l'utilisation d'ustensiles contaminés a été avancée. On peut également citer une contamination par simple contact avec les aliments (e.g. infection d'ouvriers au Royaume-Uni après contact avec des légumes crus contaminés (Morgan et al., 1988).

4.2.2 Transmission inter-humaine

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Griffin, 1995 ; Stephan et Untermann, 1999). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. D'autre part, le taux de porteurs sains est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux. Par exemple chez les éleveurs Anglais, la séroprévalence à O157 variait de 1,6% à 5% (Chalmers et al., 1999).

En outre, cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Karmali et al., 1989), les centres de soins journaliers (Reida et al., 1994) et dans les centres psychiatriques (Pavia et al., 1990). Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles (Ludwig et al., 1998) et dans les hôpitaux (Karmali et al., 1988).

La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors de colite hémorragique et de 31 jours lors de SHU (Karch et al., 1995).

4.2.3 Transmission par le milieu extérieur

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 sporadiques (Beutin et al., 2000; Coia, 1998; O'Brien et al., 2001a) mais aussi lors d'épidémies (Crump et al., 2002; Louie et al., 1999; Milne et al., 1999).

D'autre part, la baignade en lac ou pataugeoires a été citée à plusieurs reprises lors d'épidémies (Paunio et al., 1999 ; Hildebrandt et al., 1996). En effet, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre dans l'eau de baignade pendant plusieurs semaines, plus particulièrement à des températures froides (Wang et Doyle, 1998).

Par ailleurs il faut noter également la présence de STEC dans les boues et eaux de stations d'épuration (Vernozy-Rozand et al., 2002).

4.3 Principales épidémies

Les Etats-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les pays où la fréquence d'isolement du sérotype O157:H7 est la plus importante (cf. ANNEXE IV). Ce sérotype a toutefois été décrit dans différents pays européens (France, Belgique, Italie, République Tchèque, Espagne) et également en Australie, Argentine, Afrique de sud, Thaïlande, Israël, Chine et au Japon (Griffin et Tauxe, 1991 ; Lerman et al., 1992 ; Lopez et al., 1989). D'une manière générale, les STEC constituent la cause majeure des diarrhées hémorragiques et des SHU dans les pays à climat tempéré (Caprioli et Tozzi, 1998, Griffin 1998, Smith et al., 1998). Le Royaume-Uni reste le pays européen le plus touché avec une incidence des infections évaluée à plus de 2/100 000, alors qu'en France elle n'atteint que 0,8/100 000. Le sérotype O157:H7 représente 63 à 97% des STEC à l'origine de SHU (Karch et al., 1997, Pierard et al., 1997), mais néanmoins, de nombreux autres sérotypes (dont O26, O103, O111, O113, O145, O148) ont été identifiés comme responsables d'infections (Huppertz et al., 1996 ; Karch et al., 1997 ; Brooks et al., 2005 ; Espié et al., 2006).

Par ailleurs, il existe une variation saisonnière marquée de l'infection. Depuis la mise en place de la surveillance des SHU en 1996 en France, une recrudescence pendant la période estivale (juin-septembre) est observée. Cette augmentation estivale est également observée dans d'autres pays européens.

De récentes épidémies, s'ajoutant aux nombreuses apparues depuis les années 80, ont été rapportées en France et aux Etats-Unis, impliquant une nouvelle fois le sérotype O157:H7,

mais pas seulement. Le tableau VII répertorie quelques-unes de ces épidémies survenues dans le monde.

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nb de SHU + nb de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Référence
1982	Oregon-Michigan USA	O157:H7	46	Sandwich avec viande de bœuf hachée	Riley et al., 1983
1984	Nebraska USA	O157:H7	34 (4 décès)	Hamburger	Ryan et al., 1986
1991	Canada	O157:H7	152 (22 SHU et 2 décès)	Viande de caribou et de bœuf hachée	Orr et al., 1994
1992-93	Washington USA	O157:H7	501 (45 SHU et 3 décès)	Hamburger	Bell et al., 1994
1994	Washington-Californie USA	O157:H7	23 (2 SHU)	Salami sec	Tilden et al., 1996
1995	Australie	O111:H-	23 SHU (1 décès)	Saucisse sèche fermentée	Paton et al., 1996
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	Plats préparés, à base de viande crue (bœuf, porc)	Stevenson et Hanson, 1996
1996	Écosse	O157:H7	512 (34 SHU et 17 décès)	Viande de bœuf	Cowden et al., 2001
2000	Espagne	O157:H7	181 (6 SHU)	Saucisse	Martinez et al., 2001
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	Viande de mouton	Espié et Vaillant, 2003
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	Viande de boeuf	Mailles et al., 2006
1994	Angleterre	O157:H7	70 (9 SHU et 1 PTT)	Lait pasteurisé de production locale	Upton et Coia, 1994
1997	Écosse	O157:H-	37	Gâteau à la crème	O'Brien et al., 2001b
1998	Wisconsin USA	O157:H7	55	Fromage frais caillé	CDC, 2000
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé	CDSC, 2000
2001	Colombie Britannique Canada	O157:H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non pasteurisé	McIntyre et al., 2002
2005	France	O26	6 SHU	Camembert	Espié et al., 2006
1995	Montana USA	O157:H7	> 70 (1 SHU)	Laitue	Ackers et al., 1998
1996	Japon	O157:H7	9 451 (12 décès)	Radis blanc	Michino et al., 1999
1997	Michigan-Virginie USA	O157:H7	108 (4 SHU)	Germes de luzerne	Breuer et al., 2001
1996	Canada	O157:H7	70 (14 SHU et 1 décès)	Jus de pomme non pasteurisé	Cody et al., 1999
1996	Connecticut USA	O157:H7	14 (3 SHU)	Jus de pomme frais, non pasteurisé	Hilborn et al., 2000
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU, 3 décès)	Epinards	CDC, 2006

Tableau VII : Exemples d'infections à STEC, classés en fonction du type d'aliment incriminé.

5. Prévention

Afin d'éviter l'apparition d'épidémies ou de cas sporadiques liés à STEC, différentes mesures de prévention peuvent être adoptées. Celles-ci doivent s'appliquer de « l'étable à la table », autrement dit de l'élevage au consommateur. Quelques-unes de ces mesures sont citées ci-après.

5.1 Au niveau de l'élevage

Parce que le bétail est un réservoir important d'*Escherichia coli* O157:H7, de plus amples informations sur l'écologie de la bactérie sont nécessaires pour déterminer quelles interventions stratégiques pourraient être utilisées pour prévenir la transmission de l'infection à l'homme via la chaîne alimentaire. La recherche et la détermination des sources d'*Escherichia coli* O157:H7 et des autres STEC ont fait l'objet de plusieurs études (Cobbold et Desmarchelier, 2001 ; Wilson et al., 1998 ; Fremaux et al., 2006) afin de réduire la contamination des élevages. Par ailleurs le développement de tests de diagnostic rapides des animaux porteurs sains, leur dépistage avant leur arrivée à l'abattoir et des vaccinations sont à envisager. La remontée des informations à la ferme, ainsi qu'une stratégie comprenant la mise en œuvre de bonnes pratiques agricoles à l'échelon du producteur, fondée sur le principe HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) devraient être mises en place.

☆Exemple Finlandais :

Pour prévenir l'exposition du bétail aux *E. coli* verotoxinogènes, le ministère de l'Agriculture finlandais recommande :

Pour toutes les fermes

La contamination du lait, en particulier par les fèces, est prévenue par le respect des bonnes pratiques d'élevage et de traite. Le fumier ne doit croiser ni l'aliment ni l'eau de boisson des animaux. L'entrée des nuisibles dans les étables doit être stoppée. Les employés de l'exploitation doivent se laver les mains avant la traite. Tous les visiteurs d'une exploitation, mais tout particulièrement les enfants, doivent se laver les mains, ne pas porter de fumier à leur bouche et nettoyer leurs chaussures au départ de l'exploitation. L'exploitant doit prévoir des surbottes pour tous les visiteurs professionnels de son élevage. Toute l'eau utilisée en élevage doit être potable, selon les critères émis par le ministère de la Santé. A la

pâture, l'eau de boisson doit être claire, propre et non stagnante. Les bovins doivent être lavés et rincés avant de partir à l'abattoir (accord interprofessionnel de 1982).

A noter que, suite à l'épidémie survenue dans le sud-ouest mettant en cause des steak hachés contaminés par *E. coli* O157:H7, les éleveurs français ont reçu de récentes recommandations concernant la propreté des cuirs des animaux (cf. ANNEXE V). Ces nouveaux critères de propreté, mis en place dans le but de diminuer par la suite le risque de contamination des carcasses à l'abattoir, pourraient probablement influencer sur le prix de vente des animaux.

Pour les fermes où les STEC ont été isolés

Une telle exploitation doit informer l'abattoir de son statut avant tout envoi d'animaux. De la même façon, s'il s'agit d'une exploitation laitière, la laiterie doit être informée. Le vétérinaire de l'exploitation doit aussi être informé. La vente d'animaux à d'autres exploitants ou à des négociants ne devra pas être réalisée tant que les animaux ne sont pas considérés comme indemnes. Les animaux porteurs seront, quand cela est possible, séparés des animaux indemnes. Le lait cru, le colostrum ou leurs dérivés ne devront pas être commercialisés en l'état. Le lait ne devra être livré qu'à la laiterie et soumis à un traitement thermique de type pasteurisation. Le fumier ne sera pas épandu sur les pâtures ou les cultures maraîchères, ni dans des jardins individuels juste avant la récolte. Il est recommandé de le composter au moins six mois avant de l'épandre. Il devra plutôt être épandu à l'automne, juste avant la période de labourage. Le matériel agricole devra être lavé et séché avant d'être envoyé dans une autre exploitation.

Pour qu'un animal soit considéré comme indemne, il faut que les trois prélèvements espacés d'un mois d'intervalle soient tous STEC négatifs. Le coût des prélèvements et des analyses est à la charge de l'exploitant.

5.2 Au niveau des industries agro-alimentaires

5.2.1 Au niveau des abattoirs

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.).

Par ailleurs, les animaux arrivant à l'abattoir devraient être maintenus dans des conditions ne leur permettant pas de se salir. Une quantité suffisante de litière devraient être disponible tant pendant le transport que dans les stabulations. Eviter le stress de l'animal, tant au niveau du transport que pendant l'attente avant l'abattage, est essentiel.

Pour les animaux dont le cuir est sale, une procédure de nettoyage serait à envisager comme l'aspersion des carcasses avec des solutions d'acides organiques faibles. Il semble que des concentrations de 5 % d'acide acétique, lactique et citrique soient les plus efficaces contre *Escherichia coli* O157:H7 (Cutter et al., 1994). Ce type de traitement est actuellement employé aux US.

Les bonnes pratiques d'hygiène doivent s'appliquer tout au long de la chaîne d'abattage, avec une attention particulière pour les étapes de dépouillement et d'éviscération de la carcasse. Les contaminations entre la carcasse, la peau et le contenu intestinal doivent être prévenues. L'oesophage et le rectum doivent être ligaturés précautionneusement avant l'éviscération. Enfin, un dépistage systématique des animaux suspects avant l'abattage pourrait être envisagé et les autocontrôles microbiologiques en vigueur dans les abattoirs devraient inclure également la recherche des STEC sur les carcasses.

5.2.2 Au niveau des ateliers de transformation

Ce sont surtout les industries agroalimentaires des filières viande et lait qui sont tout particulièrement concernées. Les principes de la méthode HACCP sont internationalement reconnus et recommandés par le Codex Alimentarius (Codex de l'ONU pour l'Agriculture et l'Alimentation). La Directive Européenne 93/43 du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires prône la méthode HACCP pour la mise en place de la maîtrise et la sécurité alimentaire des produits.

L'application de cette méthode permet une approche structurée et logique pour prévenir et limiter la fréquence des STEC dans les denrées alimentaires. Elle permet aux industriels de définir l'ensemble des points à risque et les points critiques (CCP) tout au long de la chaîne alimentaire et de mettre en place un système de surveillance de ces points afin de pouvoir, à tout instant, intervenir dès lors que les limites préétablies sont dépassées (Criquelion, 1996). Aux Etats-Unis, l'utilisation du système HACCP a été implantée dès 1990 pour les industries de la viande, de la volaille et des produits de la mer (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, Emerging Foodborne Diseases, 1997).

Il faut éviter ou diminuer la contamination des aliments à partir des différentes sources et secteurs tout au long de la filière (transformation, transport et entreposage). Elle comporte la surveillance de l'hygiène des locaux, du matériel, de l'environnement, du personnel et du travail, complétée par les mesures de nettoyage et de désinfection rigoureuses (Ettriqui, 1989). Toutefois, la seule méthode efficace pour éliminer les *E. coli* O157:H7 des aliments consiste à leur faire subir un traitement thermique bactéricide (cuisson ou pasteurisation par exemple). Notons également qu'aux Etats-Unis, l'irradiation des produits carnés pour réduire les contaminants microbiens qui pourraient s'y trouver, est autorisée (Cahen P., 1997 ; Clavero et al., 1994 ; Lopez-Gonzales, 1999).

5.3 Au niveau du consommateur

Le consommateur manque souvent d'information et une campagne publique rappelant par exemple les dangers de la consommation de viandes insuffisamment cuites pourrait être envisagée. La multiplication des moyens de communication devrait permettre de développer plus amplement d'autres matériels d'information et d'éducation du public.

Aussi, s'agit-il essentiellement de sensibiliser le public aux problèmes de santé publique et de l'informer sur la façon de manipuler et de préparer les aliments. La cuisson de la viande avec une température à coeur d'au moins 70°C est le moyen le plus efficace de prévenir les infections, mais il faut aussi laver les légumes et éviter de consommer du lait cru ou des produits à base de lait cru.

L'éducation des personnes doit également intégrer les bonnes pratiques d'hygiène pour limiter la transmission du germe de personne à personne mais aussi la contamination croisée des aliments (Koutkia, 1997):

- ➔ Se laver les mains au savon bactéricide avant de commencer à cuisiner ;
- ➔ Se laver les mains entre la manipulation de deux aliments ;
- ➔ Les personnes qui présentent une diarrhée doivent souvent laver leurs mains (pendant au moins 30 secondes), ainsi que les gens qui travaillent dans les crèches et les maisons de santé, ceci pour éviter la transmission horizontale ;
- ➔ Éviter de placer dans le réfrigérateur un aliment sans l'avoir au préalable protégé, soit en le mettant dans une boîte hermétique, soit en l'entourant d'un film plastique ;
- ➔ Séparer les aliments crus des aliments cuits ;

- Laver soigneusement les fruits et les légumes, notamment s'ils sont consommés crus, les éplucher autant que possible ;
- Faire bouillir l'eau au moindre doute sur sa qualité ou, si ce n'est pas possible, la désinfecter à l'aide d'un agent chimique fiable et à libération prolongée, que l'on trouve habituellement en pharmacie.

Faire cuire la viande hachée jusqu'à disparition des points rosés, ne pas goûter la viande hachée crue, tenir les viandes de boeuf et de poulet séparées des autres aliments et ne pas boire de lait cru sont les conseils de consommation présentés aux Etats Unis par Tarr (1995). De plus, les consommateurs américains sont informés du risque lié à certains aliments tels que les œufs liquides, les hamburgers mal cuits et les coquillages. Les conditionnements des steaks hachés de boeuf mais aussi de l'ensemble des produits précuits à base de viande doivent porter une étiquette indiquant la nécessité de bien cuire la viande (température à coeur de 71,1°C pendant 2 min) afin d'obtenir un aliment "sain" bactériologiquement. En outre, une réglementation spécifique l'obligation d'étiqueter les laits et produits au lait cru de vache, afin d'avertir les consommateurs de leur danger potentiel de la manière suivante : « Ce lait n'a pas fait l'objet de traitement thermique, il peut donc contenir des germes dangereux pour la santé humaine ».

Modélisation de la croissance bactérienne, et physiologie des STEC

1. Modélisation de la cinétique de croissance et paramètres associés

D

Depuis les années 1980, de nombreux modèles ont été développés, d'une part, pour décrire la cinétique de croissance d'une population de micro-organismes dans un environnement donné en fonction du temps (**Modèles Primaires**) et, d'autre part, pour décrire les effets des facteurs environnementaux (Température, pH, ...) et de la flore annexe sur les paramètres de cette cinétique de croissance (**Modèles Secondaires**).

1.1 Description de la cinétique et des paramètres

La cinétique de croissance d'une population microbienne est caractérisée classiquement par quatre paramètres : le niveau initial (y_0 en \log_{10} UFC.ml⁻¹), le temps de latence (λ , appelé aussi « lag » signifiant retard en anglais), le taux de croissance maximum (μ_{\max} en h⁻¹) et le niveau maximum (y_{\max} en \log_{10} UFC.ml⁻¹). La Figure 5 présente ces paramètres sur une cinétique de croissance classiquement observée par la méthode de référence en microbiologie prévisionnelle (i.e. la méthode de dénombrement sur boîte de Petri).

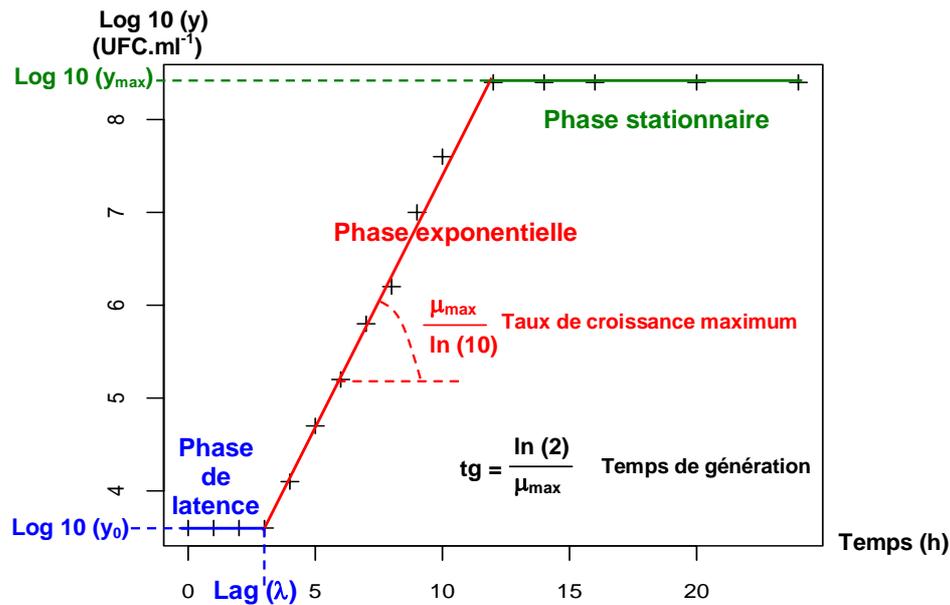


Figure 5 : Paramètres caractéristiques d'une cinétique de croissance d'une population de micro-organismes donnée.

Bien que la forme de la cinétique observée soit simple, la construction d'un modèle décrivant la globalité de la cinétique de croissance n'est pas un problème trivial. Les modèles les plus couramment utilisés en microbiologie prévisionnelle pour l'estimation des paramètres de croissance à partir de données observées sont décrits dans le paragraphe suivant.

1.2 Modèles Primaires

Le modèle primaire, dit aussi modèle dynamique, est utilisé pour décrire la réponse d'une population de micro-organismes dans un environnement donné en fonction du temps (cinétique de croissance). Ainsi, l'ajustement d'un modèle primaire à des cinétiques de croissance obtenues par dénombrement dans différentes conditions environnementales, permet l'estimation de paramètres de croissance pour chaque cinétique.

Les deux modèles les plus couramment utilisés pour l'estimation des paramètres de croissance à partir de données observées sont le **modèle de Gompertz modifié** (Gibson et al., 1988; Zwietering et al., 1990) et le **modèle de Baranyi** (Baranyi et Roberts, 1994). Citons

également le modèle de **Buchanan en 3 phases linéaires** utilisé plus récemment dans l'ajustement de données de croissance de *E. coli* O157:H7 (Buchanan et al., 1997).

► **Le modèle de Gompertz modifié :**

Ce modèle 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 et Zwietering, 1998; Whiting et 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 y_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.

La formulation mathématique (forme analytique) de ce modèle figure ci-dessous :

$$y(t) = y_0 + (y_{\max} - y_0) * \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu * \exp(1) * (\lambda - t)}{((y_{\max} - y_0) * \ln(10))} + 1\right)\right) \quad (I)$$

avec $y(t)$, la densité bactérienne (\log_{10} UFC.ml⁻¹) au temps t (heure) ; y_0 , la densité bactérienne initiale (\log_{10} UFC.ml⁻¹) ; λ (heure), la durée de la phase de latence ; μ_{\max} , le taux spécifique de croissance maximum (heures⁻¹) et y_{\max} (\log_{10} UFC.ml⁻¹), la densité bactérienne maximale.

► **Le modèle de Baranyi :**

Le modèle de Baranyi 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 et Roberts, 1994; Membre et al., 1999; Van Gerwen et 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).

La forme analytique du modèle de Baranyi est décrite ci-après :

$$y(t) = y_{\max} + \log_{10} \left(\frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \lambda) + \exp(\mu_{\max} t)}{(-1 + \exp(\mu_{\max} t)) + \exp(\mu_{\max} \lambda + (y_{\max} - y_0) * \ln(10))} \right) \quad (2)$$

avec $y(t)$, la densité bactérienne (\log_{10} UFC.ml⁻¹) au temps t (heure); y_0 , la densité bactérienne initiale (\log_{10} UFC.ml⁻¹); λ (heure), la durée de la phase de latence; μ_{\max} , le taux spécifique de croissance maximum (heures⁻¹) et y_{\max} (\log_{10} UFC.ml⁻¹), la densité bactérienne maximale.

► **Le modèle de Buchanan ou modèle en trois phases linéaires :**

Le modèle de Buchanan est un modèle très simple qui peut être décrit par trois phases : la phase de latence, la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire.

La formulation mathématique de ce modèle figure ci-dessous :

$$y(t) = \begin{cases} y_0 & \text{if } t < \lambda \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t - \lambda) & \text{if } \lambda \leq t < t_{\max} \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t_{\max} - \lambda) & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (3)$$

avec $y(t)$, la densité bactérienne (\log_{10} UFC.ml⁻¹) au temps t (heure); y_0 , la densité bactérienne initiale (\log_{10} UFC.ml⁻¹); λ (heure), la durée de la phase de latence; μ_{\max} , le taux spécifique de croissance maximum (heures⁻¹) et t_{\max} (heures), le temps auquel débute la phase stationnaire (i.e. temps pour lequel la densité bactérienne est maximale, y_{\max}).

A titre d'illustration, la Figure 6 représente l'ajustement des modèles de Gompertz modifié, de Baranyi et de Buchanan sur une même cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7 en bouillon d'enrichissement, mesurée par dénombrement sur boîte de Petri.

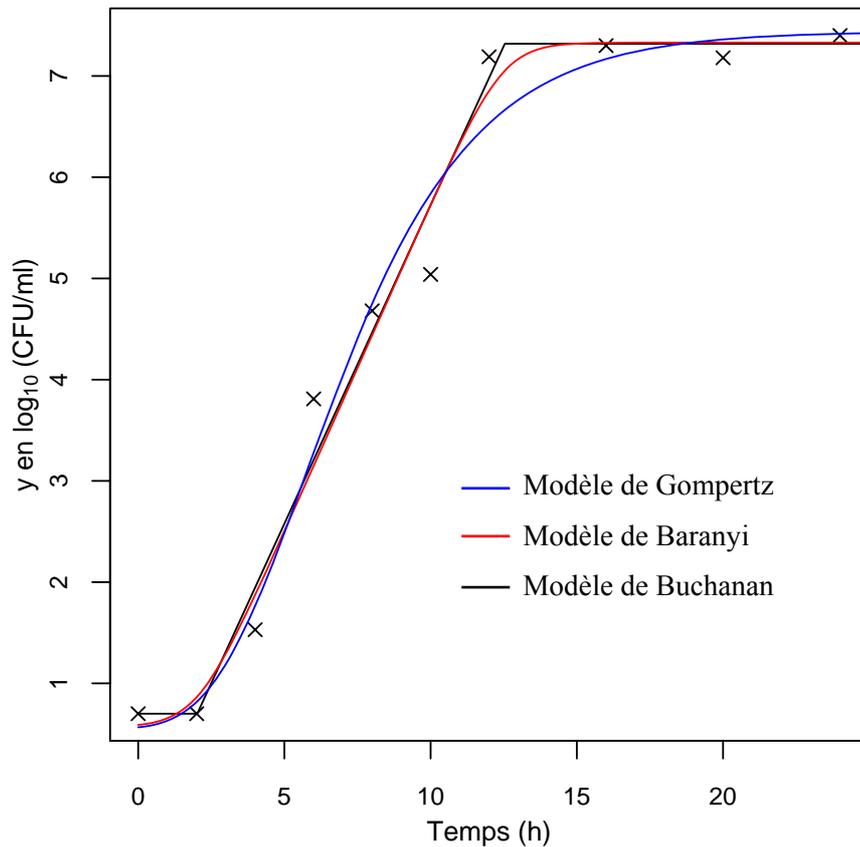


Figure 6 : Ajustement des trois modèles primaires de croissance sur une cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7.

Le Tableau VIII détaille les paramètres obtenus après l'ajustement de cette cinétique de croissance (Figure 6) par les trois modèles. Le modèle de Buchanan en trois phases (modèle très simple) ajuste en général bien les données et donne des estimations assez proches de celles obtenues avec le modèle de Baranyi.

	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	λ (h)	y_0 (\log_{10} UFC.ml ⁻¹)	y_{\max} (\log_{10} UFC.ml ⁻¹)
Gompertz	1,83	2,57	0,55	7,44
Baranyi	1,49	2,05	0,59	7,33
Buchanan	1,45	2,02	0,7	7,32

Tableau VIII : Estimation des paramètres caractéristiques de la croissance par ajustement des modèles de Gompertz modifié, Baranyi et Buchanan à une cinétique de croissance d'une souche de *E. coli* O157:H7.

2. Effets des facteurs environnementaux

Divers modèles secondaires ont été proposés pour décrire l'effet des facteurs environnementaux sur le taux de croissance (μ_{\max}) et le temps de latence (lag). Parmi les premiers travaux ont été proposés des modèles mécanistes construits à partir d'hypothèses biologiques, et des modèles descriptifs construits à partir des données observées. Les modèles mécanistes ont, du fait de leur complexité et de leur mauvais ajustement aux données expérimentales, été progressivement abandonnés au profit des modèles descriptifs.

Parmi les travaux proposés aujourd'hui, on peut distinguer deux grandes approches méthodologiques différentes de construction de modèles descriptifs. L'**approche multifactorielle** consiste à décrire l'effet simultané de plusieurs facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance à l'aide de modèles polynomiaux. L'**approche 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). Les modèles développés selon cette approche sont fréquemment appelés les modèles de type racine carrée (Ratkowsky et al., 1983).

2.1 Modélisation du taux spécifique de croissance maximum (μ_{max})

Divers modèles généraux ont ainsi été proposés pour décrire l'effet de la température et du pH (voire même 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, Ross et al., 2003; Tamplin et al., 2005).

En utilisant le modèle CTMI (Approche progressive/Modèles de croissance de type racine carrée) de Rosso et al. (1995) pour ajuster les valeurs de μ_{max} observées à différentes températures, Gonthier et al. (2001) ont rapporté les valeurs de la température optimale (T_{opt}) de croissance (température pour laquelle μ_{max} atteint une valeur optimale) de 20 souches de sérotype O157 et de 12 souches de *E. coli* non-O157. Ces auteurs ont montré ainsi une différence entre les T_{opt} de souches de STEC O157:H7 et de *E. coli* non-O157. Des valeurs moyennes égales à 40,2°C et 41,2°C ont respectivement été rapportées pour les STEC O157:H7 et les *E. coli* non-O157. D'autre part, ces auteurs ont mis en évidence une variabilité de T_{opt} entre souches, plus importante pour le groupe des STEC O157:H7 (valeurs variant entre 38,5°C et 41,5°C) que pour le groupe des *E. coli* non-O157 (valeurs allant de 40,4°C à 41,9°C). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Palumbo et al. (1995) et Salter et al. (1998).

De plus, Nauta et Dufrenne (1999) ont déterminé les températures cardinales sur 75 souches différentes de *E. coli* O157:H7. Ces auteurs ont rapporté des valeurs de T_{opt} variant entre 37 et 41°C avec une moyenne de 40,1°C. Concernant T_{min} , des valeurs de 6 à 12°C ont été 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.

L'effet du pH sur le taux de croissance a également été étudié. En milieu synthétique de laboratoire, *E. coli* O157:H7 montre, en moyenne, des valeurs de pH_{opt} d'environ 6,9 et de pH_{max} de 9,4 (Nauta et Dufrenne, 1999). 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 et Knight, 1999), 4,3 pour l'acide citrique (Nauta et Dufrenne, 1999) et de 5,5 pour l'acide acétique (McKellar et Knight, 1999). Les acides organiques sont en effet plus efficaces que les acides minéraux pour inhiber la croissance de *E. coli* O157:H7 (Buchanan et 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. 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.

Nous ne disposons actuellement que de très peu de données concernant l'effet de l'activité de l'eau sur la croissance des STEC et selon les données de l'ICMSF (1996), l'activité de l'eau minimale pour la croissance (a_{wmin}) de *E. coli* O157:H7 est de 0,96.

Pour conclure, l'effet de ces trois facteurs environnementaux sur le μ_{max} de *E. coli* O157:H7 peut-être observé sur la Figure 7, représentant les taux de croissance simulés avec un modèle de type racine carrée pour diverses valeurs de température, pH et a_w , dans du BHI.

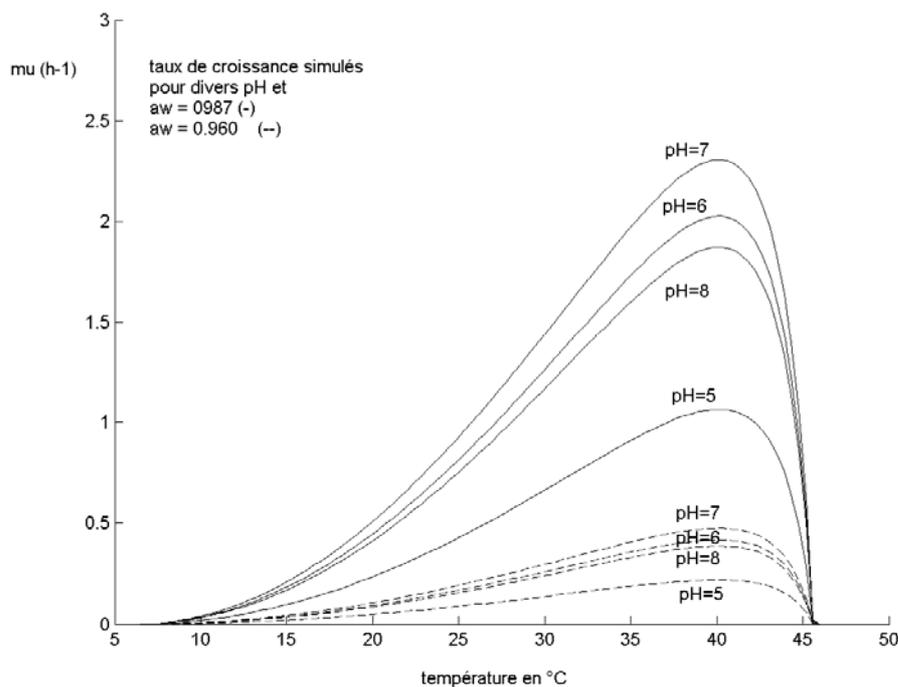


Figure 7 : Taux de croissance calculés dans diverses conditions environnementales avec un modèle de type racine carrée (Extrait du bilan des connaissances relatives au STEC, AFSSA 2003).

2.2 Modélisation du temps de latence (λ ou lag)

Certains auteurs (Guillier et al., 2005 ; Pinon et al., 2004 ; Pouillot et al., 2003) considèrent que pour des conditions de préculture données, le temps de latence est inversement proportionnel au taux de croissance quelles que 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 ($\mu_{\max}\text{lag}$) pour modéliser ce temps de latence.

Cependant, il est nécessaire pour prévoir le temps de latence par cette méthode, de connaître les conditions de préculture afin de pouvoir quantifier leurs effets sur le produit $\mu_{\max}\text{lag}$. En effet, l'impact de la température de préculture sur le lag de différents pathogènes a été caractérisé par Dufrenne et al. (1997), qui ont montré que l'utilisation d'une température de préculture peu élevée donnait, par la suite, des temps de latence beaucoup plus faibles lors de cultures à température basse (i.e. des valeurs de $\mu_{\max}\text{lag}$ faibles). En outre, Augustin et al. (2000) ont démontré expérimentalement sur *Listeria monocytogenes* un effet de la taille de l'inoculum sur le temps de latence qui augmente lorsque la taille de l'inoculum initial est faible. Whiting et Bagi (2002) ont mis en évidence que des cellules de *Listeria monocytogenes* en phase exponentielle avaient un temps de latence plus court comparées à des cellules en phase stationnaire ou cultivées dans des conditions de stress. Enfin, Duffy et al. (1999) ont montré que le temps de latence de *E. coli* O157:H7 augmentait lorsque le pH et la température d'incubation diminuaient.

Ainsi, Baranyi et Roberts (1995) ont relié ce produit $\mu_{\max}\text{lag}$ à ce qu'ils appellent l'état physiologique initial de la population microbienne. Selon eux, $\mu_{\max}\text{lag}$ 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 l'hypothèse de la constance du produit $\mu_{\max}\text{lag}$ n'est qu'approximative et que ce produit $\mu_{\max}\text{lag}$ peut également évoluer en fonction des conditions de culture. Delignette-Muller (1998) a étudié l'évolution du produit $\mu_{\max}\text{lag}$ (ou lag/tg) en fonction de diverses conditions de cultures à partir de 9 publications, reportant des données de μ_{\max} et lag obtenues dans diverses conditions environnementales pour différentes espèces bactériennes (dont *E. coli* O157:H7). Pour chaque jeu de données, les effets des facteurs environnementaux sur la variable $\ln(\text{lag}/\text{tg})$ ont été modélisés. Il a été mis en évidence une

corrélation linéaire négative entre le pH et cette variable sur 5 des 9 jeux de données. Autrement dit, ceci peut être relié à un stress physiologique induit par l'introduction des cellules dans un milieu acide, induisant alors une augmentation du travail à effectuer par les cellules bactériennes pour s'adapter au nouvel environnement.

En outre, Delignette-Muller et al. (2005) ont proposé un modèle permettant de décrire l'évolution du produit $\mu_{\max}\text{lag}$ en fonction des températures de préculture (T_{prior}) et de culture (T_{growth}). Il apparaît, selon ces auteurs, que le produit $\mu_{\max}\text{lag}$ augmente linéairement lorsque la différence entre ces deux températures ($T_{\text{growth}} - T_{\text{prior}}$) s'accroît. Ainsi le produit $\mu_{\max}\text{lag}$ peut évoluer en fonction des conditions de culture et ne semble pas, par conséquent, uniquement lié aux conditions de préculture.

En conclusion, il s'avère à l'heure actuelle difficile d'estimer le temps de latence, car aucun modèle général ne permet de prévoir correctement le temps de latence pour les STEC sans expérience préalable visant à quantifier l'effet des conditions de pré-inoculation.

2.3 Modélisation du niveau maximum atteint (y_{\max})

En ce qui concerne la densité bactérienne maximale atteinte au niveau de la phase stationnaire de croissance (y_{\max}), peu de données sont actuellement disponibles. Néanmoins, Tamplin et al. (2005) ont proposé un modèle décrivant l'effet de la température sur ce paramètre à partir de cinétiques de croissance d'*Escherichia coli* O157:H7 obtenues dans de la viande de bœuf hachée stérilisée. Selon ces auteurs, lorsque la température augmente de 8 à 45°C, les valeurs de y_{\max} diminuent respectivement de 9,7 à 8,2 log UFC.g⁻¹. Le pouvoir explicatif du modèle qu'ils proposent ($r^2=68\%$) ne semble pas très intéressant et l'applicabilité d'un tel modèle à la prévision de croissances dans de la viande non stérilisée est fortement compromise.

En effet, la flore annexe naturellement présente dans le steak haché semble également avoir un impact sur la croissance d'*Escherichia coli* O157:H7 (cf. paragraphe suivant), nettement plus important que celui de la température mis en évidence par Tamplin et al. (2005) en culture pure.

3. Effets de la flore annexe

Une interaction microbienne se définit par l'effet d'une population sur la croissance de l'autre (et éventuellement réciproquement). L'effet de chaque population sur l'autre peut être positif (raccourcissement du lag, accroissement de μ_{\max} et de y_{\max}) ou, plus fréquemment, négatif (allongement du lag, diminution de μ_{\max} et de y_{\max}). Ainsi, seuls les effets négatifs de la flore annexe sur les pathogènes (notamment *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes*) seront abordés dans cette partie et ceci même si certaines études ont pu, par exemple, mettre en évidence un commensalisme entre plusieurs souches de *E. coli* O157:H7 et *E. coli* K12 (Cornu et al., 1999) ou encore, un possible effet positif de la flore annexe sur la croissance de *Listeria monocytogenes* (del Campo et al., 2001).

Dans l'aliment, il est généralement constaté que la plupart des interactions microbiennes *in situ* se limitent à une diminution de y_{\max} , sans effet sur les paramètres μ_{\max} et lag (Carlin et al., 1996 ; Buchanan et Bagi, 1997 ; del Campo et al., 2001). Néanmoins, certains auteurs ont mis en évidence une action de la flore annexe sur le lag et le μ_{\max} de *E. coli* O157:H7 (Duffy et al., 1999). Cette partie abordera donc, dans un premier temps, les effets de la flore annexe sur le niveau maximal (y_{\max}) atteint par la flore pathogène puis, dans un second temps, les effets de la flore annexe sur les autres paramètres de croissance (λ , μ_{\max}) de la flore pathogène.

3.1 Modélisation du niveau maximum atteint (y_{\max})

L'effet de la flore annexe sur la flore pathogène (e.g. les STEC, *L. monocytogenes*...) est fréquemment négatif et il est, qui plus est, généralement constaté que la plupart des interactions microbiennes se limitent à une diminution de y_{\max} , sans effet sur les paramètres μ_{\max} et lag (Carlin et al., 1996 ; Buchanan et Bagi, 1997 ; del Campo et al., 2001). Ainsi, il est observé que la flore minoritaire (e.g. la flore pathogène) n'est pas influencée par la flore majoritaire (e.g. flore annexe) dans les premières phases de la croissance. En revanche, il a été montré que cette flore minoritaire atteint sa densité maximale (y_{\max}) plus rapidement qu'en culture pure, puisque sa phase stationnaire apparaît dès lors où la flore majoritaire atteint son propre y_{\max} (Jameson, 1962 ; Grau et Vanderlinde, 1992 ; Beumer et al., 1996 ; Devlieghere et al., 2001). Ce freinage simultané des flores (e.g. flore pathogène et flore annexe) au temps auquel débute la phase stationnaire (t_{\max}) est désigné sous le terme « d'effet Jameson » (Ross

et al., 2000), qui correspond potentiellement à l'épuisement d'une ressource limitante commune aux deux flores.

Nous pouvons citer le modèle proposé par Cornu et al. (2002), permettant de décrire une interaction de type compétition entre une flore pathogène (i.e. *L. monocytogenes*) et la flore annexe d'un aliment (i.e. saumon) et dont l'hypothèse principale est basée sur cet effet Jameson. Selon cette hypothèse, toutes les flores décelèrent simultanément et la flore pathogène (minoritaire) entre en phase stationnaire à un niveau de population inférieur à celui qu'elle aurait pu atteindre seule (i.e. en culture pure). Ce modèle repose sur une fonction de freinage de type logistique sur la flore totale, égale à $1 - \frac{y_{FA}(t) + y_{FP}(t)}{y_{\max_{TOTAL}}}$ pour l'évolution au cours du temps de chacune des 2 densités bactériennes $y_{FA}(t)$ et $y_{FP}(t)$ des deux flores. La saturation à un niveau maximum total ($y_{\max_{TOTAL}}$) pourrait donc être interprétée comme une limitation de la croissance des deux flores par une ressource limitante commune (substrat, espace...) avec compétition entre la flore pathogène et la flore annexe pour cette ressource commune (Gimenez et Dalgaard, 2004 ; Delignette et al., 2006).

L'utilisation prévisionnelle de ce modèle a par ailleurs été testée sur des données de la littérature et l'estimation de la densité finale de *L. monocytogenes* en culture mixte s'est avérée plus précise avec ce modèle qu'avec ceux ne prenant en compte aucune interaction. En effet ces derniers, estimant le y_{\max} en culture mixte par le y_{\max} en culture pure, conduisent à une sur-estimation de la croissance finale de la flore pathogène (Cornu et al., 2002). Ce dernier point souligne donc bien l'effet provoqué par la flore annexe sur le niveau maximal atteint en phase stationnaire.

Cet effet de compétition de la flore annexe avec la flore pathogène (minoritaire) peut également être modélisé très simplement en utilisant le modèle de Buchanan (3). En effet, il est alors possible de modéliser globalement les cinétiques de croissance de la flore pathogène (*E. coli* O157:H7) et de la flore annexe en utilisant l'équation (3) pour chaque flore et en imposant un freinage simultané avec le paramètre t_{\max} commun aux deux flores. Ainsi, l'ajustement des données par ce modèle global de croissance, basé sur l'hypothèse d'une compétition simple entre les deux flores, permet de modéliser l'arrêt de la croissance de la flore pathogène lorsque la flore annexe atteint son niveau maximal en phase stationnaire

(Effet Jameson) (Figure 8), en supposant que celle-ci est majoritaire par rapport à la flore pathogène.

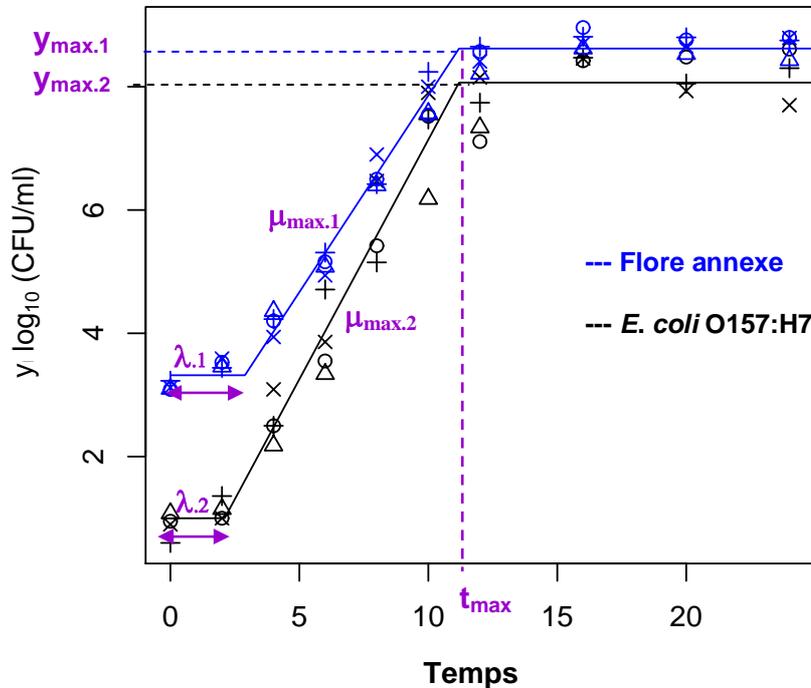


Figure 8 : Exemple de cinétiques de croissance simultanées de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe du steak haché, ajustées à l'aide du modèle de Buchanan, en supposant le paramètre t_{\max} commun.

Tamplin et al. (2002), dans une autre étude sur *E. coli* O157:H7, montre également que, si le taux de croissance ne semble pas être affecté par la présence de la flore annexe dans le produit, le $y_{\max_{O157}}$ est lui particulièrement affecté par cette présence et passe d'environ $9 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ dans du bœuf stérile à des valeurs comprise entre 4 et $6 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ dans du bœuf naturellement contaminé en flore annexe et non conditionné sous vide. Ces auteurs constatent donc une interaction entre *E. coli* O157:H7 et la flore annexe, même si ces derniers ne vont pas jusqu'à la modéliser.

Néanmoins, la fonction de freinage proposée par Cornu et al. (2002) et basée sur une hypothèse de compétition simple entre flores pour une ressource limitante ne peut s'appliquer

à toutes les interactions. En effet l'action antagoniste de la flore annexe peut certes être liée à l'épuisement du milieu en nutriments essentiels (comme évoqué précédemment), mais également à la diminution du pH liée à la production d'acides gras volatils à chaîne courte (acide acétique, lactique ou propionique) ou encore à la production de bactériocines ayant une activité inhibitrice spécifique. De nouveaux modèles mécanistes ont d'ailleurs été proposés par Van Impe et al. (2005) pour expliquer les raisons de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Ces modèles intègrent à la fois les effets de l'épuisement du substrat et de la production d'une substance toxique par la flore annexe sur la croissance d'une bactérie cible.

L'effet d'une diminution du pH, induit par la production d'acides organiques par la flore annexe, sur la croissance des STEC a été évoqué dans le paragraphe 2 (Effet des facteurs environnementaux). Toutefois, dans certains cas, la flore annexe peut « protéger » les STEC des conditions acides (Duffy et al., 1999). Parmi les bactériocines ayant une efficacité inhibitrice sur les STEC, deux grands types ont été étudiés à ce jour : celles produites par des Entérobactéries (e.g. colicines et microcines) et celles produites par les bactéries lactiques (e.g. nisine et reutélines). Vold et al. (2000) ont ainsi mis en évidence des effets très marqués de la flore annexe de la viande hachée sur la croissance d'*Escherichia coli* O157:H7, avec parfois une inhibition totale de la croissance du pathogène.

3.2 Effet de la flore annexe sur les autres paramètres de croissance (λ , μ_{max})

Duffy et al. (1999) ont observé le comportement à 15 et 37°C d'une souche de *E. coli* O157:H7 inoculée ($3 \log_{10}$ UFC.ml⁻¹) en milieu synthétique en présence de différentes flores annexes ($4 \log_{10}$ UFC.ml⁻¹) : *Pseudomonas fragi*, *Brochothrix thermosphacta*, *Hafnia alvei* et *Pediococcus acidilactici*, fréquemment isolées dans les produits carnés bruts ou transformés (McMahon 1997). Ces auteurs montrent qu'à 37°C et à pH=7, *Hafnia alvei* inhibe de façon significative la croissance de *E. coli* O157:H7. En effet, en présence de ce type de flore, le lag de *E. coli* O157:H7 (λ_{O157}) est significativement plus long (~3 heures) qu'en culture pure (~1 heure). Le taux spécifique de croissance maximum de *E. coli* O157:H7 ($\mu_{max-O157}$) se trouve également significativement diminué (0,6 versus 1,5 \log_{10} UFC.ml⁻¹ en culture pure) et il en est de même pour le niveau maximal atteint par *E. coli* O157:H7 ($y_{max-O157}$).

En outre, en présence de *Brochothrix thermosphacta* et *Pediococcus acidilactici*, les valeurs de λ_{O157} augmentent et passent respectivement à 2,7 et 3,4 heures. Néanmoins, il est important de souligner que la présence de ces 2 flores n'induit aucun effet sur $\mu_{\max-O157}$ et $y_{\max-O157}$. De même, la présence simultanée des quatre flores annexes avec *E. coli* O157:H7 implique uniquement un allongement de λ_{O157} , sans modifier les 2 autres paramètres de croissance du pathogène.

En revanche, toujours dans le cadre de cette étude, il est rapporté qu'à 15°C *P. fragi* (bactérie d'altération des viandes se développant rapidement aux températures de réfrigération) allonge significativement la phase de latence de *E. coli* O157:H7 de plus de 3 heures, sans toutefois altérer son taux de croissance et sa densité maximale. Cette action inhibitrice (via la production potentielle de composés toxiques pour *E. coli* O157:H7) est toutefois faible et n'existe plus en présence de *Brochothrix thermosphacta*, autre bactérie d'altération des viandes.

3.3 Conclusion

La présence d'une flore microbienne annexe semble donc avoir un effet significatif sur le comportement de *E. coli* O157:H7. Les interactions entre la flore annexe et la flore pathogène peuvent se traduire par des effets positifs sur la santé humaine dans le cas d'une compétition dans l'aliment, mais peuvent également revêtir des aspects négatifs, notamment lors de la recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 dans les aliments. En effet, les effets induits par la présence d'une flore annexe (allongement du temps de latence, diminution du taux de croissance et de la densité maximale atteinte) peuvent potentiellement conduire à l'obtention de faux négatifs. Duffy et al. (1999) soulignent d'ailleurs les implications négatives que peut avoir, le type d'interaction de compétition mis en évidence dans leur étude entre *E. coli* O157:H7 et les Entérobactéries, lors de la recherche du pathogène à partir de bouillons d'enrichissement d'échantillons contenant des nombres élevés d'Entérobactéries.

Cette problématique a fait l'objet de nos premières études dont l'objectif était d'étudier, dans différents milieux d'enrichissement, la croissance de *E. coli* O157:H7 et de STEC non-O157:H7 en présence de la flore annexe de trois matrices (steak haché, lait et fèces de bovins).

Les protocoles de recherche de *Escherichia coli* O157:H7 et des STEC dans les aliments, la matière fécale et l'environnement

1. Echantillonnage

L'échantillonnage constitue la première étape importante du protocole de recherche du pathogène. En effet, le résultat final obtenu et les mesures correctives éventuellement adoptées en conséquence sont directement liés et tributaires du type et de la taille de l'échantillon.

Comme évoqué dans la partie « Epidémiologie Alimentaire et Humaine », les produits carnés à base de viande bovine font partie des aliments majoritairement incriminés. C'est pourquoi il a été choisi ici de présenter les méthodes d'échantillonnage réalisées au sein de la filière viande dans le cadre des systèmes de contrôle de la qualité. La présence des STEC dans les produits carnés, tel le steak haché, est fréquemment liée à une contamination initiale des carcasses de bovins au niveau de l'abattoir. Les paragraphes suivants font état, d'une part, des méthodes de prélèvement utilisées pour l'échantillonnage des carcasses de bovins à l'abattage et, d'autre part, des autres types de prélèvements réalisés au niveau de l'abattoir et des industries de transformation.

1.1 Au niveau de l'abattoir

1.1.1 Carcasses

1.1.1.1 Adhésion des bactéries à la surface des carcasses

Lors du processus d'abattage des bovins (plus précisément lors du dépouillement et de l'éviscération), les carcasses peuvent subir des contaminations de surface par des bactéries pathogènes ou non-pathogènes qui proviennent principalement des fèces, du contenu digestif ou du cuir des animaux. A noter qu'une inter-contamination des carcasses est également possible.

Selon Selgas et al. (1993), le mécanisme d'adhésion des bactéries se fait en 2 étapes :

❶ La 1^{ère} étape est une étape réversible pendant laquelle les bactéries sont liées via un film d'eau à la viande (ou à la peau). Cette « adhésion » est la résultante d'interactions de type forces de Van der Waals ou électrostatiques. Cette adhésion est également due aux interactions existantes entre appendices externes (flagelles, fimbriae, polysaccharides externes...) de la cellule bactérienne et récepteurs de la surface considérée (ici de la viande).

❷ La 2^{ème} étape est une étape d'adhésion irréversible. La bactérie produit une matrice d'exopolymères (glycocalyx) qui la protège des attaques extérieures (i.e. agents nettoyants, surfactants..) et lui confère ainsi un environnement favorable pour son développement et également pour l'adhésion d'autres bactéries, débris, etc., entraînant ainsi la formation de biofilms. Cette adhésion irréversible des cellules bactériennes à la surface des carcasses peut se produire au bout de 30 minutes à quelques heures.

NB : De nombreux facteurs, tels le pH, la température, le temps de contact, la densité bactérienne et l'osmolarité peuvent influencer l'adhésion des bactéries aux surfaces. En outre, l'adhésion elle-même dépend de caractéristiques intrinsèques à la bactérie.

Des analyses bactériologiques de la surface des carcasses sont effectuées afin de contrôler l'état d'hygiène de la viande. Ces analyses font appel à différentes méthodes de prélèvement décrites dans la littérature.

1.1.1.2 Méthodes de prélèvement

Il est important de rappeler qu'il n'existe actuellement aucun critère microbiologique applicable aux denrées alimentaires pour *E. coli* O157:H7 et les autres STEC (Règlement CE N° 2073/2005, Considérant 14). Ainsi, les méthodes détaillées ci-dessous, qui sont habituellement employées pour la recherche d'autres pathogènes (i.e. *Salmonella*, *Listeria*) ou le dénombrement des flores indicatrices d'hygiène (i.e. *Enterobacteriaceae*, *E. coli*), peuvent également être utilisées pour la recherche des STEC et de *E. coli* O157:H7 à la surface des carcasses.

A l'heure actuelle, il existe trois principales méthodes de prélèvement pour le contrôle microbiologique des carcasses de bovins: **les méthodes dites destructives, non-destructives et par contact.**

1.1.1.2.1 Avantages et limites de ces 3 principales méthodes

Afin de mieux appréhender les divers avantages et limites présentés par chaque méthode, une brève description (description plus détaillée dans le 1.1.1.3) de chacune d'entre elles est préalablement réalisée.

L'excision (dite méthode destructive) consiste à prélever, à l'aide par exemple d'une pince emporte-pièce, un échantillon de tissu superficiel sur la carcasse. Les méthodes non-destructives par « chiffonnage » (*swabbing en anglais*) consistent à frotter un écouvillon (une éponge, un tampon de gaze ou une chiffonnette...) sur une surface délimitée de la carcasse. Pour les méthodes par contact, des boîtes de gélose (contenant différents milieux selon le contrôle bactériologique souhaité) sont appliquées à la limite de l'écrasement sur une zone de la carcasse. Les avantages et limites de ces trois principales méthodes sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau IX).

Méthode	Avantages	Limites
Destructive : -excision -carottage	<ul style="list-style-type: none"> - Exactitude des résultats - Faible variabilité des résultats - Récupération de la quasi-totalité des bactéries (même celles fortement liées à la surface des carcasses) 	<ul style="list-style-type: none"> - Détérioration de la carcasse - Faible surface échantillonnée
Non-destructive (Chiffonnage)	<ul style="list-style-type: none"> - Aucune détérioration de la carcasse - Surface échantillonnée importante - Praticité élevée - Appropriée pour la recherche de bactérie(s) répartie(s) de façon non homogène sur la carcasse 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible reproductibilité et répétabilité des résultats - Taux de récupération faible
Par contact	<ul style="list-style-type: none"> - Aucune détérioration de la carcasse - Praticité élevée (au niveau du prélèvement et de l'analyse au laboratoire) 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de récupération faible - Surface plane uniquement - Faible surface échantillonnée

Tableau IX : Avantages et limites des trois méthodes de prélèvement les plus utilisées (selon Capita et al., 2004).

L'atout majeur de l'excision est incontestablement son taux de récupération des bactéries qui est, du fait du principe même de la méthode (prélèvement d'un tissu excisé de la carcasse), supérieur à celui des autres méthodes. Cette méthode destructive affiche également une meilleure répétabilité et reproductibilité des résultats.

Paradoxalement, le prélèvement d'un tissu excisé peut constituer le facteur limitant de cette technique. En effet, après excision, la carcasse se retrouve quelque peu « détériorée », ce qui peut être commercialement préjudiciable pour l'abatteur. De ce fait, la surface échantillonnée ne peut être que faible (de 25 à 50 cm²), ce qui peut engendrer, d'une part, dans le cas d'un dénombrement bactérien des inexactitudes importantes lorsque la contamination totale est faible et/ou répartie de façon hétérogène ou, d'autre part, dans le cas de la recherche de pathogène(s), l'absence de détection du pathogène cible lorsque sa présence sur la carcasse est irrégulière.

Les méthodes non-destructives par « chiffonnage » présentent quelques avantages intéressants comme l'absence de « détérioration » des carcasses à l'issue des prélèvements, la simplicité et la praticité de l'échantillonnage et surtout la possibilité d'échantillonner une surface importante de la carcasse. Ce dernier point révèle toute son importance dans la recherche de bactéries réparties de façon non homogène sur la carcasse (tel *E. coli* O157:H7) et permet ainsi de garantir davantage l'hygiène des carcasses. Néanmoins, ces méthodes ont un taux de récupération des bactéries souvent variable et inférieur (cf. 1.1.1.2.2) à l'excision. En effet, les méthodes non-destructives sembleraient capables uniquement de récupérer les cellules bactériennes faiblement liées au tissu superficiel des carcasses. De plus, les résultats obtenus avec ces méthodes sont souvent peu reproductibles et peu répétables étant donné la variabilité liée à l'opérateur (différence de pression exercée sur l'éponge lors du chiffonnage) et au matériel utilisé (différence de performances, cf. 1.1.1.2.2).

La simplicité et la praticité sont également deux atouts affichés par les méthodes de prélèvement par contact, tant au niveau du prélèvement de l'échantillon lui-même qu'au niveau de son analyse au laboratoire. Elles permettent, qui plus est, de préserver l'intégrité de la carcasse en évitant toute détérioration liée à l'échantillonnage. Toutefois, ces méthodes ont un taux de récupération des bactéries souvent faible et deviennent inappropriées lorsque la surface à échantillonner n'est pas plane. En outre, la surface échantillonnée reste faible, ce qui peut induire (comme dans le cas de l'excision) des inexactitudes dans les niveaux de dénombrement obtenus ou l'absence de détection de bactérie(s) cible(s).

L'excision et les méthodes de prélèvement par « chiffonnage » sont deux techniques incluses dans la nouvelle réglementation de l'UE (ayant pris acte le 1^{er} janvier 2006) pour l'analyse microbiologique des carcasses à l'abattoir [ISO 17604:2003]. L'excision reste la méthode la plus utilisée en France et ceci grâce, en partie, à sa plus grande fiabilité (moins de variabilité dans les résultats obtenus) et ses meilleures performances en terme de décrochage des bactéries fortement liées à la paroi. Néanmoins, les techniques de prélèvement par « chiffonnage » sont celles qui sont, à l'heure actuelle, pour des raisons d'ordre pratique et économique, les plus employées dans le reste de la Communauté Européenne et également dans beaucoup d'autres pays du monde.

1.1.1.2.2 Performances des méthodes par chiffonnage vs excision

Les méthodes non-destructives sont autorisées si leurs performances ont toutefois été préalablement démontrées. En effet, il existe un grand nombre de méthodes non-destructives (écouvillonnage en milieu humide ou sec, prélèvement à l'aide d'éponge, de chiffonnette, de tampon de gaze...) dont les performances sont très variables.

Certains auteurs (Eisel et al., 1997 ; Gill et Jones, 2000) ont montré que les quantités relatives de bactéries récupérées par chiffonnage ne représentent que 0,01 à 89% des quantités de bactéries récupérées par l'excision (considérée comme méthode de référence). D'autres pourcentages sont rapportés dans la littérature et varient de 6 à 16% (Anderson et al., 1987), de 1 à 14% (Lazarus et al., 1977), de 33 à 47% (Emswiler et al., 1978) ou encore de 16 à 45% (Hambraeus et al., 1990). Le tableau X (extrait d'une synthèse sur les méthodes de prélèvement, Capita et al., 2004) reporte les taux de récupération (issus de diverses études comparatives) de l'excision *versus* ceux des méthodes de prélèvement par chiffonnage.

Cette importante variabilité est liée à de nombreux facteurs. La source de variabilité la plus importante est le type de matériel utilisé pour réaliser le prélèvement. En effet, la matière utilisée pour le chiffonnage doit répondre à 2 fonctions essentielles : la première étant de décrocher suffisamment les bactéries de la paroi et la deuxième de pouvoir les relarguer dans le diluant utilisé. Les matières utilisées pour le chiffonnage sont principalement composées d'alginate, de cellulose, de polyuréthane, de coton, de ouate ou bien encore de gaze. En outre, les matières les plus abrasives semblent améliorer la récupération des bactéries liées aux surfaces, notamment pour de faibles niveaux de contamination. Certaines études ont montré que les prélèvements par chiffonnage réalisés avec des matières comme l'alginate ou le coton (non abrasif) ont des taux de récupération 10 fois inférieurs à ceux de l'excision, alors que les

matières abrasives ont des taux similaires à ceux de l'excision. (Anderson et al., 1987 ; Gill et Jones, 2000)

Outre la matière utilisée, d'autres facteurs liés à la réalisation du prélèvement peuvent également avoir un effet sur les performances des méthodes non-destructives. Il est par ailleurs reconnu que les résultats obtenus par l'application d'une méthode non-destructive sont plus hétérogènes dans leur répétabilité, notamment en raison du facteur important de variabilité représenté par le temps et la pression d'application exercés par l'opérateur pour réaliser le prélèvement. Il a été montré, qui plus est, que l'humidification de la surface échantillonnée ou de la matière utilisée pour le chiffonnage améliore les taux de récupération des méthodes non-destructives (Fliss et al., 1991 ; Kitchell et al., 1973).

D'autre part, l'état de la carcasse peut intervenir sur les performances des méthodes. Ware et al. (1999) ont montré que le temps de stockage des carcasses influence manifestement les taux de récupération des bactéries puisqu'un grand nombre de celles-ci se retrouvent en phase d'adhésion irréversible (sachant que l'adhésion peut-être différente d'une espèce à l'autre). En outre, la texture de la surface échantillonnée intervient sur le nombre de bactéries récupérées ; des études ont montré que les taux de recouvrement sur des échantillons de tissus adipeux étaient inférieurs à ceux reportés sur des échantillons de tissu maigre (muscle) (Gill et Jones, 2000).

Microorganismes	n [†]	Méthodes non destructives					Référence
		Excision	Eponge	Tampon de gaze	Ecouvillon	Ouate	
FAMT*	25	1,65-2,05	1,67-2,53	1,58-2,37	-	1,47-2,09	Gill et Jones, 2000
FAMT	64	2,6	2,1	-	1,3	-	Dorsa et al., 1996
FAMT	30	1,6	1,3	-	-	-	Dorsa et al., 1997
Coliformes	30	6	0	-	-	-	
<i>E. coli</i>	30	2	-1	-	-	-	
FAMT	10	4,7 [‡]	3,4 [‡]	-	-	-	Bacon et al., 2002

* Flore Aérobie Mésophile Totale ; [†] Nombre de carcasses échantillonnées ; [‡] Prélèvement sur tissus adipeux

Tableau X : Enumération (log₁₀ UFC/cm²) de microorganismes sur la surface de carcasses de bovins échantillonnées à l'aide de méthodes destructive et non-destructive (selon Capita et al., 2004).

En revanche, même si les performances des méthodes non-destructives sont moindres par rapport à celles affichées par l'excision en terme de récupération, elles peuvent, dans certains cas, s'avérer plus performantes. Gill et Jones (2000) ont montré que le nombre d'échantillons positifs en coliformes et *E. coli* augmente lorsque la taille de la surface échantillonnée s'accroît (10 à 1000 cm²) (Tableau XI). En effet, pour des bactéries en faible nombre et qui plus est, réparties de manière non homogène sur la surface de la carcasse (e.g. *E. coli* O157:H7 et les autres STEC), l'accroissement de la surface échantillonnée permet manifestement un meilleur recouvrement.

Surface Echantillonnée	Nombre d'Echantillons Négatifs	
	Coliformes	<i>E. coli</i>
10 cm ²	16	19
100 cm ²	11	12
1000 cm ²	2	5

Tableau XI : (selon (Gill et Jones (2000))) : 25 demi-carcasses de bovins ont été échantillonnées par un tampon de gaze sur une surface de 10, 100 ou 1000 cm². Le tableau ci-dessous reporte le nombre d'échantillons pour lesquels aucun coliforme ou *E. coli* n'a été détecté (Echantillons Négatifs).

1.1.1.3 Exemples de protocoles d'échantillonnage sur carcasses de bovins

L'utilisation de telles ou telles méthodes peut parfois dépasser le cadre strictement scientifique. La plupart des pays européens (la France faisant figure d'exception) utilisent les méthodes non-destructives pour le prélèvement d'échantillons à la surface des carcasses de bovins, techniques validées depuis Janvier 2006 à l'issue d'un fort lobbying de la part de certains états membres. Les raisons de ce lobbying peuvent se cacher derrière un réel contexte politique ! En effet, certains pays de l'UE utilisant habituellement les méthodes par chiffonnage affichent des résultats conformes aux critères microbiologiques européens (cf. ANNEXE VI), ce qui n'est plus le cas lorsqu'ils utilisent l'excision (techniquement plus performante en terme de taux de recouvrement des bactéries de surface).

Les procédures de contrôle microbiologique de surface des carcasses d'animaux de boucherie sont définies désormais dans le règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. La décision 2001/471/CE du 8 juin 2001 sera donc définitivement abrogée très prochainement. Les modalités de prélèvements décrites dans ce nouveau règlement communautaire correspondent

à présent à la norme ISO 17604:2003 dans laquelle l'utilisation de méthodes destructives ou non-destructives est notifiée.

Cas de nombreux pays de l'Union Européenne et des Etats-Unis

Un grand nombre d'exploitants d'abattoirs européens et américains utilisent les méthodes non-destructives pour le contrôle microbiologique des carcasses de bovins au sein de leur établissement. Les autocontrôles de leurs produits sont réalisés comme suit.

① Sites de prélèvement

Les emplacements de prélèvement choisis dépendent des pratiques de l'abattoir. Le but est, en effet, d'examiner les emplacements présentant la plus forte prévalence de contamination. Les emplacements les plus souvent échantillonnés (i.e. qui présentent la plus forte prévalence de contamination) sont indiqués sur la figure 9 :

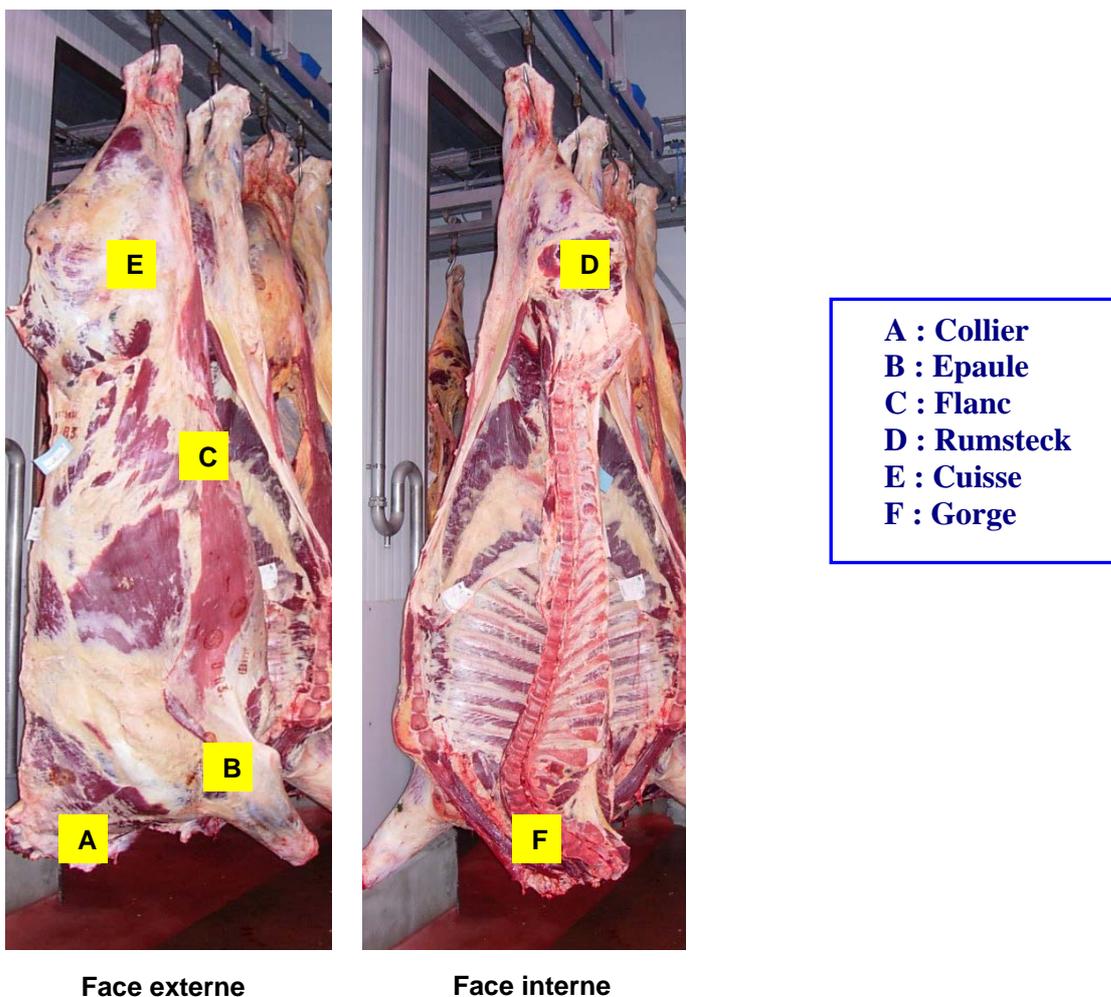


Figure 9 : Sites obligatoires de prélèvement en cas de contamination d'une carcasse de bovin.

② Moment de prélèvement

Les moments de prélèvement doivent être sélectionnés selon les principes de l'évaluation des risques et liés aux étapes du processus identifiées comme problématiques. Les points de contrôles suivants sont donc recommandés pour l'analyse des carcasses de bovins :

- après dépouillement des cuirs
- après éviscération
- dans la chambre de réfrigération, 12h au moins après l'abattage

Les prélèvements sont généralement réalisés avant l'habillage ou le ressuage de la carcasse (cf. processus d'abattage, ANNEXE VII).

NB : Aux Etats-Unis, des contrôles sont également réalisés après le traitement (aspersion avec des acides organiques faible ou de la vapeur d'eau) des carcasses.

③ Techniques de prélèvement

Humidifier préalablement un écouvillon, une éponge ou un tampon de gaze avec 10ml de diluant peptone sel (Photo 1). A chaque emplacement de prélèvement choisi sur la carcasse, placer un gabarit stérile (10x10 cm²) sur la surface et frotter l'écouvillon sur la surface délimitée en exerçant une pression et en le déplaçant d'abord horizontalement puis en tournant l'écouvillon de manière que toutes les faces soient utilisées. Pour l'éponge et le tampon de gaze, frotter sur la surface délimitée une dizaine de fois à la verticale et à l'horizontale. A l'issue du chiffonnage, replacer l'écouvillon/éponge/gaze dans son sac d'origine et ajouter un volume complémentaire de diluant pour préserver les bactéries jusqu'à l'analyse au laboratoire.

Enfin, il est important de souligner que le nouveau règlement stipule l'utilisation d'éponges abrasives pour les prélèvements d'échantillons destinés aux analyses portant sur *Salmonella*. La surface d'échantillonnage recommandée est d'au moins 100 cm² par zone d'échantillonnage choisie. A noter que cette nouvelle mesure rejoint les différentes conclusions reportées dans le paragraphe sur « *Les performances des méthodes par chiffonnage vs l'excision* » (cf. 1.1.1.2.2) indiquant, pour les matières abrasives (Photo 2), un meilleur recouvrement des bactéries et l'intérêt d'échantillonner une surface plus grande (réalisable uniquement avec des méthodes non-destructives) pour la recherche de bactéries réparties de façon irrégulière (e.g. *Salmonella*) sur la surface des carcasses.

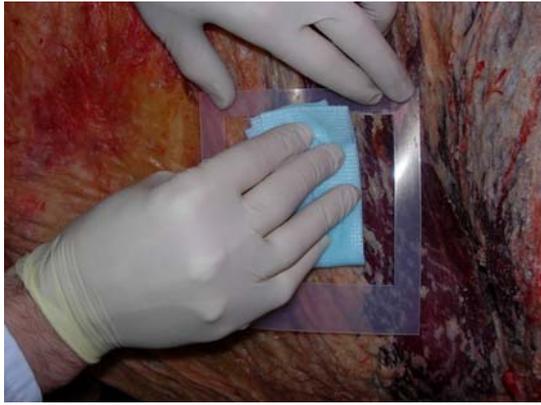


Photo 1 : Méthode de prélèvement non-destructive (chiffonnette).

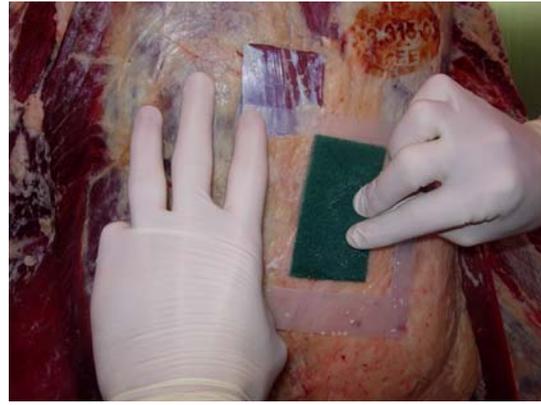


Photo 2 : Méthode de prélèvement non-destructive (éponge abrasive).

④ Procédure et plan d'échantillonnage

Le moment et la fréquence des prélèvements sont régis par la technologie d'abattage, le volume de la production et l'état épidémiologique de la région dont les animaux sont originaires.

Dans le cas du contrôle des processus, il doit exister un lien entre le moment et la fréquence des prélèvements et la qualité de l'hygiène d'abattage. Ainsi il est conseillé de contrôler 5 demi-carcasses (provenant de 5 carcasses différentes réparties sur une demi journée de tuerie) tous les 5 jours d'abattage effectif.

Dans le cas de la surveillance des pathogènes, il convient que le moment et la fréquence des prélèvements donnent la plus grande chance d'isoler les agents pathogènes recherchés. A noter qu'il n'existe aucune réglementation pour la recherche des STEC.

Cas de la France ou de l'exception Européenne :

Dans le cas des procédures de prélèvements effectuées couramment par les abatteurs français, les points ①②④ restent manifestement inchangés et seule la technique de prélèvement diffère (excepté pour la recherche de *Salmonella*) :

③' Techniques de prélèvement

Pour chaque site de prélèvement, une excision du tissu conjonctif sous cutané (de 2 mm d'épaisseur et 5 cm² de superficie) de la carcasse est réalisée à l'aide d'un emporte-pièce ou d'un scalpel (Photo 3). L'échantillon est ensuite placé dans un sac pour analyse.



Photo 3 : Méthode de prélèvement destructive (excision).

1.1.2 Autres types de prélèvement

Afin d'évaluer l'hygiène générale en ce qui concerne les conditions de production dans les établissements de viandes d'animaux de boucherie, des prélèvements supplémentaires ou complémentaires (i.e. surfaces de travail, cuirs et fèces des animaux) à l'échantillonnage des carcasses sont régulièrement réalisés.

1.1.2.1 Surfaces de travail

Un contrôle des surfaces au niveau de l'abattoir doit être réalisé toutes les 2 semaines au minimum (ou tous les 10 jours d'activité effectifs et au moins une fois par mois) afin de s'assurer de l'hygiène de l'abattage (Note de service DGAL, 10 JUIN 2002). La méthode de référence pour le contrôle des surfaces est la méthode des boîtes de contact, mais bon nombre de méthodes existent à l'heure actuelle et sont employées pour le contrôle des surfaces nettoyées et désinfectées (Photo 4). Quelle que soit la méthode utilisée, 10 échantillons doivent être prélevés (au minimum) dans une zone de production. Les sites devant faire l'objet de la plus grande attention sont manifestement les zones qui entrent ou peuvent entrer en contact avec les carcasses. Les sites suivants peuvent ainsi faire l'objet d'un échantillonnage : appareils de stérilisation des couteaux, machines d'ensachage du côlon, scie et fendeuse de carcasses, instruments de dépouillement des bovins, d'habillage, portes battantes, structures aériennes d'où peut s'écouler de l'humidité...etc.



Photo 4 : Exemple de kit de prélèvement pour l'échantillonnage de surfaces.

1.1.2.2 Cuirs

L'échantillonnage du cuir des animaux est régulièrement réalisé (principalement aux Etats-Unis) pour prévenir ou limiter une auto-contamination et inter-contamination des carcasses par des pathogènes. A noter que des prélèvements du cuir des animaux sont également effectués dans le cadre de plan de surveillance de *Salmonella* et des STEC. Plusieurs techniques ont été étudiées pour mener à bien ce type de prélèvement (Ransom et al., 2002, Reid et al., 2001 ; Barkocy-Gallagher et al., 2005) :

- Par chiffonnage du cuir de l'animal à l'aide d'une éponge humidifiée ou d'une gaze ;
- Par excision d'un morceau de cuir de 100cm² ;
- Par tonte des poils du cuir de l'animal ;
- Par rinçage d'une zone définie sur le cuir de l'animal et récupération des effluents.

Ransom et al., 2002 ont montré que la méthode de prélèvement la plus facile à utiliser et la plus efficace pour la recherche de *E. coli* O157:H7 et de *Salmonella* sur les cuirs de bovins était le chiffonnage du cuir de l'animal (sur 3 sites spécifiques de 100cm² : poitrine, flanc et train arrière) à l'aide d'une éponge humidifiée (BIOTRACE SA). Des scientifiques américains (Meats Research Unit Scientists of the US Meat Animal Research Center) ont également mis en avant l'efficacité et la praticité des méthodes par chiffonnage pour l'étude de la prévalence de *E. coli* O157:H7 à l'abattoir (Communication personnelle, M. Koohmaraie).

1.1.2.3 Fèces

De même, des prélèvements de fèces sont effectués pour prévenir des contaminations sur la chaîne d'abattage ou dans le cadre d'études de la prévalence de pathogènes comme les STEC.

Les techniques de prélèvement sont moins nombreuses et se limitent au simple prélèvement de 10 à 25g de fèces, soit fraîchement émises au sol, soit récupérées dans le rectum ou le côlon. Néanmoins, la recherche de *E. coli* O157:H7 peut également se faire après éviscération par chiffonnage d'une partie (~100cm²) de l'intérieur du côlon de l'animal. Ransom et al., 2002 ont mis en évidence une plus grande efficacité de cette méthode (par rapport au prélèvement de fèces) pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans la matière fécale.

1.2 Au niveau de l'industrie de transformation

Afin d'éviter la présence de STEC dans leur produits finis, les industriels de l'agro-alimentaire peuvent également (dans le cas où l'abattoir n'est pas couplé à l'usine de transformation) réaliser des prélèvements de surface (comme évoqué précédemment) sur les quartiers avants ou demi carcasses (à réception) destinés à la fabrication de steak haché. Qui plus est, des prélèvements complémentaires peuvent être effectués sur les minerais juste avant le hachage final. Enfin, d'ultimes analyses sont évidemment réalisées sur les produits finis avant leur mise sur le marché. A noter que des prélèvements environnementaux de surface sont également réalisés dans les ateliers de transformation, à l'image de ce qui a été décrit précédemment au niveau de l'abattoir.

1.2.1 Minerais (trimming en anglais)

Ce type de prélèvement est peu commun en France, mais est pratique courante aux Etats-Unis pour la recherche de *E. coli* O157:H7. Néanmoins, il n'existe aucun protocole américain standardisé pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les minerais et les divers protocoles en vigueur dans les industries varient en fonction du nombre de combo bins (i.e. conteneurs où sont stockés les minerais avant le hachage) testés, du type d'échantillon (tissus excisés, prélèvements par chiffonnage ou carottage dans le cas de minerais congelés), de la masse de viande collectée ou encore du nombre d'échantillons poolés en un échantillon composite...etc. Les prélèvements de minerais par excision ou chiffonnage sont réalisés sur le dessus des combos car ces derniers sont remplis extrêmement rapidement et en continu. Ainsi, le prélèvement de minerais équivaut à prendre un échantillon toutes les **P** périodes de temps (la période (**P**) étant égale au temps nécessaire pour remplir un combo à partir des minerais découpés sur les lignes).

Quelques protocoles utilisés dans les industries de transformation aux Etats-Unis (McNamara, 2003) sont relatés ci-dessous. La technique de prélèvement utilisée dans ces protocoles est l'excision et la notion de « lot » est définie comme la totalité du chargement en minerais (20 combos, soit 18 tonnes) d'un camion.

Certains protocoles consistent à prendre 75g de tissus excisés à partir de chacun des 20 combos et à rassembler les 20 échantillons de 75g dans un échantillon composite unique et homogène de 1500g. A partir de cet échantillon composite, cinq échantillons de 75g sont

ensuite collectés et rassemblés en un seul et nouvel échantillon composite de 375g, destiné à la recherche de *E. coli* O157:H7 au laboratoire.

D'autres méthodes plus fines consistent à subdiviser le lot de 20 combos en 4 groupes de 5 combos et à prélever 75g de minerais à partir de chacun des 5 combos constituant un groupe. Les 5 échantillons de 75g sont ensuite regroupés dans un échantillon composite de 375g pour la recherche de *E. coli* O157:H7. Un lot est ensuite accepté si aucun des 4 échantillons composites de 375 g (collectés respectivement à partir des 4 groupes de 5 combos) n'est détecté positif.

Des études sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de ces différents protocoles utilisés dans les industries américaines mais les dernières recommandations de l'ICMSF (International Commission on Microbial Specifications for Foods) conseillent le prélèvement et l'analyse d'au moins 750g de minerais dans la totalité du chargement d'un camion (soit l'équivalent de 18 tonnes) pour la recherche de *E. coli* O157:H7.

1.2.2 Steak Haché

La prévalence de *E. coli* O157:H7 et des autres STEC a sensiblement augmenté ces dernières années dans les produits carnés, notamment en France. Un grand nombre d'industriels français, à l'instar de leurs homologues américains, font à présent systématiquement la recherche de *E. coli* O157:H7 dans leurs produits. Il n'existe toutefois à l'heure actuelle, en France comme aux Etats-Unis et dans d'autres pays européens, aucun protocole standardisé pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans le steak haché. En effet, à l'image de ce qui a été évoqué précédemment pour la recherche des STEC dans les minerais, différents protocoles sont mis en place dans les industries, et varient principalement en fonction du nombre (fréquence d'échantillonnage) de prises d'essai effectué et de la masse de chacune de ces prises d'essai.

Il y a donc une nécessité aujourd'hui, notamment en France (les Etats-Unis ayant pris une avance certaine sur le sujet), d'évaluer et de comparer différents protocoles d'échantillonnage et de détection afin d'améliorer la recherche de *E. coli* O157:H7 et des autres STEC dans le steak haché, tout en tenant compte des contraintes industrielles. Après avoir développé le calcul, à partir de la loi de *Poisson*, de la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 (ou des STEC) en fonction de la prise d'essai réalisée, nous présenterons quelques protocoles d'échantillonnage effectués aux US.

Le tableau ci-dessous (Tableau XII) indique la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir en fonction de la masse de la prise d'essai réalisée et du niveau de contamination du hachoir. Ces probabilités ont été calculées selon *la distribution de Poisson*, supposant une contamination homogène de la totalité de la mûlée présente dans le hachoir. Cette hypothèse paraît recevable compte tenu des temps de pré-hachage et hachage opérés (Reinders et al., 2003 ; Toft et al., 2006) :

$$P = 1 - e^{-(C \cdot M)}$$

avec *P*, la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 ; *C*, le niveau de contamination de la mûlée (UFC.g⁻¹) ; *M*, la masse de steak haché (taille de l'échantillon) prélevée (g).

D'après *la distribution de Poisson*, la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir contaminé à une concentration moyenne de 0,04 UFC.g⁻¹ (1 UFC/25g), est égale à 63% lorsque la prise d'essai est de 25g. Pour ce même niveau de contamination, cette probabilité augmente à hauteur de 95% avec une prise d'essai de 75g. Le même raisonnement peut également être adopté pour les échantillons de lait puisque la contamination dans ce type d'échantillon semble encore plus homogène.

Niveau de contamination de la mûlée (UFC <i>E. coli</i> O157:H7.g ⁻¹)	Probabilité de détection de <i>E. coli</i> O157:H7 selon la prise d'essai réalisée (%)				
	25g	75g	125g	375g	750g
4.10 ⁻³ (0,1 UFC/25g)	10	26	39	78	95
0,04 (1 UFC/25g)	63	95	99	99,99	100
0,1	92	99,9	99,99	100	100
1	100	100	100	100	100

Tableau XII : Probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans un hachoir en fonction de la prise d'essai réalisée.

Aux Etats-Unis, plusieurs industriels ont adopté la méthode « Jack-In-The-Box » (suite à l'épidémie survenue après la consommation de hamburgers contaminés par *E. coli* O157:H7 provenant des restaurants du même nom) pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les mûlées de haché. Cette méthode consiste à collecter un steak haché en bout de ligne de fabrication (aux US, « a patty », soit environ 114g) toutes les 15 minutes lors d'une journée de production. Chaque heure les 4 steaks hachés sont regroupés dans un échantillon unique et

homogène d'environ 450g, sur lequel seulement 25g de haché seront testés pour la détection de *E. coli* O157:H7.

Un autre protocole réalisé dans les industries américaines a pour but de prélever à la sortie d'un hachoir de 1,4 tonnes (correspondant un lot) trois échantillons de 25g de haché (au début, au milieu et à la fin du lot) rassemblés ensuite en un échantillon unique et homogène de 75g. Quatre échantillons de 75g sont ensuite regroupés dans un échantillon composite homogène de 300g (représentant 5,5 tonnes de viande) et 75g de cet échantillon composite sont ensuite prélevés pour la recherche de *E. coli* O157:H7.

En France, un nombre très variable (d'un industriel à un autre) de prises d'essai de 25g par mêlée ou lot de steaks hachés est effectué. Ces prises d'essai peuvent être analysées individuellement ou regroupées pour former des échantillons composites sur lesquels seront réalisées les analyses. Peu de connaissances sont, à l'heure actuelle, disponibles en France sur la question du pooling des échantillons et de la quantité de haché à collecter par mêlée afin de s'assurer de l'absence du pathogène *E. coli* O157:H7 dans les lots de steaks hachés distribués sur le marché.

Au regard de ces interrogations multiples sur la question du prélèvement d'échantillons, l'AFSSA a par ailleurs été récemment saisie par la DGAL d'une demande d'appui scientifique et technique relative aux modalités d'échantillonnage à mettre en œuvre dans la filière de production des viandes hachées.

2. Protocole d'enrichissement

L'enrichissement correspond à la deuxième étape du protocole de recherche des STEC. En effet, la plupart des méthodes de détection utilisées à l'heure actuelle nécessitent une étape d'enrichissement, étant donné les faibles niveaux de contamination retrouvés dans les échantillons environnementaux ou alimentaires responsables d'épidémies (Shinagawa 1997). Dans cette partie la Publication N°1 est tout d'abord présentée (A. Vimont, C. Vernozy-Rozand and M.-L. Delignette-Muller. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Letters in Applied Microbiology* 42 (2006) 102–108). Les principaux résultats obtenus sont évoqués, et quelques éléments complémentaires sont apportés.

2.1. Présentation de la Publication N°1

Le travail présenté ici avait pour objectif global de rassembler les données bibliographiques relatives aux principaux protocoles d'enrichissement utilisés pour la détection de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157 dans différentes matrices.

Plus précisément, cette étude bibliométrique avait pour but, premièrement, d'évaluer la distribution en fréquence des différents facteurs d'enrichissement utilisés (i.e., le type de milieu [BROTH], l'ajout d'antibiotique(s) [ATB] ou d'autres ingrédients sélectifs [SI], la durée [DURATION] et la température [TEMP] de la période d'incubation (cf. Table 2 de la Publication N°1)), deuxièmement, de mettre en évidence d'éventuels profils d'association entre les différents facteurs d'enrichissement à l'aide de l'AFCM (Analyse Factorielle à Correspondances Multiples) et, troisièmement, de résumer les résultats publiés concernant les performances de ces protocoles d'enrichissement.

Cette synthèse, en donnant une photographie précise de tous les facteurs caractérisant les protocoles d'enrichissement actuellement utilisés, constituait une étape préalable et indispensable aux études menées ultérieurement sur la description et l'optimisation de la phase d'enrichissement au cours de cette thèse.

2.2. Résultats et discussion

Cette synthèse a mis en évidence une plus large utilisation de 3 milieux d'enrichissement : le Trypticase Soya Broth (39,3%), le milieu *E. coli* (25,3%) et l'Eau

Peptonée Tamponnée (15,6%). D'autre part, il a été montré que, dans 60% des cas, un antibiotique était ajouté au milieu d'enrichissement et que la novobiocine était celui le plus fréquemment utilisé. Enfin, l'étude révèle que les échantillons sont majoritairement incubés à 35 ou 37°C, pendant 16 à 24h.

De plus, une AFCM a permis de mettre en évidence, d'une part, que la température d'incubation du bouillon d'enrichissement est choisie sans tenir compte du sérotype recherché (STEC non-O157 ou O157) et, d'autre part, que le choix de l'antibiotique ajouté au milieu d'enrichissement ne prend pas en compte la matrice analysée (et donc la flore annexe de cette matrice). Or, il est important d'adapter l'ajout d'antibiotique à la flore annexe de l'échantillon analysé puisque le but de la phase d'enrichissement est d'assurer une croissance des STEC tout en limitant la croissance de la flore annexe présente dans l'échantillon. L'analyse des données récoltées nous a conduit à conclure que l'enrichissement de divers échantillons dans le but de détecter les STEC et *E. coli* O157:H7 était réalisé de façon quelque peu aléatoire.

Cette étude bibliométrique se termine par la description des performances de divers protocoles d'enrichissement et montre que les rares résultats publiés divergent. La comparaison de ces résultats s'est également avérée difficile, étant donné l'utilisation de méthodes de screening différentes. Enfin, ces résultats sont peu satisfaisants d'un point de vue statistique, en raison du faible nombre d'expérimentations menées et, qui plus est, du faible nombre de sérotypes étudiés.

Il convient néanmoins de relativiser les résultats obtenus à l'issue de cette étude car notre synthèse intègre quelques études visant à comparer plusieurs milieux d'enrichissement. Les conclusions de cette synthèse bibliométrique ont ainsi motivé la réalisation d'études ultérieures ayant pour objectif d'évaluer l'effet des principaux facteurs d'enrichissement mis en évidence dans cette synthèse sur la croissance de *E. coli* O157 ou des STEC et de la flore annexe de différentes matrices durant la phase d'enrichissement.

2.3. Eléments complémentaires

Certains éléments importants sont toutefois absents dans cette synthèse et, c'est pourquoi, quelques éléments complémentaires sont apportés sur la masse d'échantillon à analyser (cas du steak haché) ainsi que le volume de milieu à ajouter. Des détails concernant le volume de milieu à ajouter pour les autres types de prélèvement clôturent cette partie.

2.3.1 Masse d'échantillon testée et volume de milieu ajouté

Comme vu précédemment dans le paragraphe 1.2.2, les industriels de la viande font appel au pooling d'échantillons. Cette pratique couramment utilisée aux US, intéresse de plus en plus les industriels français pour la simple raison qu'ils peuvent améliorer la probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 dans leurs produits grâce à une prise d'essai plus importante par lot (Tableau XII) et ceci sans multiplier le nombre de tests effectués (gain financier). En outre, la masse de l'échantillon composite obtenu après le pooling des différentes prises d'essai varie d'un industriel à un autre et peut s'échelonner de 75 à 375g. Néanmoins, quelques études mettent en évidence les limites du pooling d'échantillons.

Une étude américaine (McNamara et al., 2005) a évalué l'influence du pooling d'échantillons sur la détection de *E. coli* O157:H7 par différentes méthodes de screening. Trois échantillons composites (75, 125 et 375g) ont alors été testés par ces différentes méthodes après 8, 12 et 16h d'enrichissement. Il a été montré que l'augmentation de la masse de steak haché ou de minerais analysée avait pour conséquence une diminution de la sensibilité de détection des méthodes. Une incubation plus longue semble palier le manque de sensibilité des méthodes testées mais une masse d'échantillon trop importante de haché ou minerais peut toutefois engendrer l'obtention de faux négatifs.

Dans cette étude, le volume de milieu ajouté aux différentes prises d'essai a été ajusté afin de conserver un ratio « masse d'échantillon/volume de milieu » égal à 1:10 (i.e., 75g:675ml ; 125g:1125ml ; 375g:3375ml). Une récente étude américaine a néanmoins montré (Guerini et al., 2006) que l'utilisation d'un ratio 1:3 donnait des résultats semblables à ceux obtenus avec un ratio de 1:10 et permettait ainsi de réduire le coût lié aux importants volumes de milieux utilisés, notamment dans le cas d'échantillons composites.

2.3.2 Volume de milieu ajouté pour les autres types de prélèvement

Le pooling d'échantillons de surface (carcasses ou environnement) peut, en fonction du type de matériel utilisé pour effectuer le prélèvement, s'avérer très variable selon les industriels. Pour la détection des STEC, le volume de milieu d'enrichissement ajouté à l'échantillon varie principalement entre 200 et 300 ml selon la taille de l'éponge/chiffonnette/gaze utilisée.

Il convient de noter que, dans le but de dénombrer la FAMT et les entérobactéries, l'éponge ou l'écouvillon ayant servi au prélèvement est simplement remis en suspension dans 10 à 25ml de diluant (selon la taille de l'éponge ou de l'écouvillon).



PUBLICATION N°1



ORIGINAL ARTICLE

Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand and M.-L. Delignette-Muller

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

Keywords

bibliometric study, enrichment protocol, *Escherichia coli*, MCA, O157:H7, shiga-toxin.

Correspondence

Antoine Vimont, UMAP laboratory, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France.
E-mail: a.vimont@vet-lyon.fr

2005/0661: received 10 June 2005, revised and accepted 26 September 2005

doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01818.x

Abstract

Aims: To review and characterize the enrichment protocols used for detecting all Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) from different matrices.

Methods and Results: Firstly, the frequency distribution of the factors characterizing the enrichment protocols is described; secondly, a multiple correspondence analysis is performed to display profiles of association of these factors, and thirdly, published results concerning the relative performances of the protocols are summarized. Trypticase Soy Broth (TSB) is reported as the most frequently used enrichment broth. More often, one antibiotic is added in enrichment broths and these broths are incubated for a duration of 16–24 h at 35–37°C. It also appears that the incubation temperature does not seem to be related to the type of serogroup looked for and that antibiotics are used regardless of the matrix analysed. Finally, results relating to the enrichment protocol efficacy are rare and differ from one study to another.

Conclusions: Statistical studies must be conducted so as to assess the efficacy of the main enrichment protocols investigated in this study.

Significance and Impact of the Study: This study reviews the most commonly used enrichment protocols and highlights the lack of results as to their relative efficacy.

Introduction

Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) are an emerging cause of food-borne illness and have become a public health priority (Catarama *et al.* 2003). STEC regroups *Escherichia coli* O157:H7 (O157) and other serogroups of STEC (non-O157). Illness is often linked to the consumption of contaminated or undercooked ground beef, unpasteurized milk, cheese or fruit juices, but transmission by other means such as swimming in faeces-contaminated water is also possible (Al-Gallas *et al.* 2002).

Moreover, in the food or environment samples responsible for diseases, the levels of contamination with O157 are sometimes very low (Shinagawa 1997). Thus very sensitive detection methods are required.

Different methods of screening of O157 are available nowadays: genetic methods [like Polymerase Chain Reac-

tion (PCR); Bouvet and Vernozy-Rozand 2000] and immunological methods [Immunomagnetic Separation (IMS); ISO EN 16654 ELISA] (Foster *et al.* 2003). Most of these methods require an enrichment step in order to increase their respective threshold of detection (Lionberg *et al.* 2003).

Several types of enrichment broths are currently used for STEC before their detection by screening methods (Cui *et al.* 2003; McKee *et al.* 2003). Furthermore, some researchers incorporate selective agents (such as various antibiotics and bile salts) in the broths (Catarama *et al.* 2003; Foster *et al.* 2003), whereas others prefer to use nonselective broths (Bhaduri and Cottrell 2001). Some authors use long incubation periods (Grant 2004) while others prefer short incubation periods (Ibekwe and Grieve 2003). Some authors also incubate the broths at 41°C (Hepburn *et al.* 2002) whereas others use 37°C (Li and Mustapha 2004).

The objective of this study was to review all the enrichment protocols, which have been reported in the literature since 1997. Hence, this work was performed in order firstly, to describe the frequency distribution of the factors characterizing the enrichment protocols, i.e. basal medium, antibiotics, selective ingredients, incubation duration and temperature; secondly, to display possible profiles of association of these factors, and thirdly, to summarize published results concerning the relative performances of the protocols.

Materials and methods

Data gathering

A bibliometric study was carried out with the aim of reviewing the different enrichment protocols used to date. The bibliometric study was performed in the following way: the gathering of publications was made with the following keywords '*enrichment AND coli AND (O157* OR ((Shiga* OR Vero*) AND toxi*))' on PubMed from January 1997 to October 2004. A total of 181 publications were gathered, but some of them were withdrawn from this study: articles which do not belong to the listing of the scientific journals selected (Table 1) and papers which do not precisely report the enrichment factors previously quoted above. Thus, a total of 132 papers were analysed. Moreover, some papers can be quoted more than once in our bibliometric study because they describe more than one experiment. For instance, if one or more factors differed in three experiments in the same paper, these three experiments were included in our study. Thus, a total of 380 experiments were analysed.

Table 1 Listing of the scientific journals retained for the study of the distribution of the various factors characterizing enrichment protocols and their frequency of appearance in the bibliometric study

Name of journals	No. of papers
Applied and Environmental Microbiology	14
Epidemiology and Infection	4
Fems Microbiology Letters	1
Immunology and Medical Microbiology	1
International Journal of Food Microbiology	23
Journal of AOAC International	4
Journal of Applied Microbiology	14
Journal of Clinical Microbiology	7
Journal of Food Protection	31
Journal of Microbiological Methods	5
Letters in Applied Microbiology	17
Microbiology and Immunology	3
Diagnostic Microbiology Infection and Disease	1
Research in Microbiology	1
Veterinary Microbiology	6

The enrichment protocol factors correspond, throughout the study, to the variables analysed, which are the type of basal medium (BROTH), the possible addition of antibiotics (ATB) and/or selective ingredients (SI), the duration and temperature (TEMP) of incubation period (Table 2).

Statistical analyses

A multiple correspondence analysis (MCA) was also performed with the package ADE4 (Thioulouse *et al.* 1997) adapted to 'R' statistical software (Ihaka and Gentleman 1996). MCA is one of the multivariate analysis techniques that allow simultaneous graphical description of a set of qualitative variables, according to the intensity and level of association between them. It is worth noting that the double enrichment protocols were not included in the multiple correspondence analysis because of the low number of studies using these protocols (the use of two successive temperatures of incubation or two successive broths). The variable SCREENING was not included in the MCA either, because of its lack of interest in our study.

Results

Distribution of the various variables

Table 2 summarizes the distribution of the different modalities of the various variables studied. From this table, it can be seen that there are more studies carried out on O157 (79%) than on non-O157 (21%). The matrices in which they were screened are raw meat and ground beef (36.5%), other matrices (27.6%), swimming or drinking waters and juices (12.2%), feces (16.8%) and milk and dairy products (6.9%). Moreover, the study reports that the most frequent broths used, are TSB (39.3%), EC (25.3%) and BPW (15.6%). In 46% of the experiments, an addition or a modification of the concentration of the selective ingredients in the broths was carried out for this purpose. Bile salts are the most often selective ingredient added in broths (95% of the cases) and were used in 53% of the experiments if we take into account their presence in EC. Moreover, the study reports that at least one antibiotic is mainly added in the enrichment broths (60%), and that novobiocin is the most often used antibiotic (89.3%). The different broths are incubated most often between 16 and 24 h (51%), and incubated mainly at 35–37°C (63%).

Main correlations existing between variables

Figure 1 shows the result of the MCA in a two dimensional plane, according to the two first axes of the MCA

Table 2 Definition of the different variables included in the analysis and their respective distribution on 380 experiments

Definition of the variable	Coding variable	Definition of the modalities	Coding of the modalities	Distribution (%)
Serogroup	SEROGROUP	All serogroups, except O157:H7	non-O157	21
		O157:H7	O157	79
Screening method	SCREENING	Genetic methods	G	21
		Immunological methods	I	49
		Biochemical methods	B	30
Matrix	MATRIX	Any raw meat and minced beef	MEAT	36.5
		Milk and dairy products	MILK	6.9
		Swimming or drinking water and Juice	WATERJU	12.2
		Any faeces	FECES	16.8
		Soils, mushrooms, sprouts, seeds...	OTHERMAT	27.6
Broth	BROTH	Trypticase soy broth	TSB	39.3
		<i>E.coli</i> broth	EC	25.3
		Buffer peptone water	BPW	15.6
		Use of two successive broths	DOUBLEBRO	5.1
		Little used broths	OTHERBRO	14.7
		None	0.ATB	40
Number of antibiotics incorporated	ATB	One	1.ATB	41
		Two	2.ATB	5
		Three	3.ATB	14
		None	0.SI	54
Supplementation or modification of the original concentration of selective ingredients	SI	Incorporation or modification	1.SI	46
Incubation period	DURATION	6–15 h	D6-15	35
		16–24 h	D16-24	51
		>25 h	Dsup25	14
Incubation temperature	TEMP	35 or 37°C	LowT	63
		41, 42, 44 or 44.5°C	HighT	31
		Double successive temperatures	MultT	6

(52% of inertia). For a better readability, this representation is split by variables. However, if we superimpose each of the seven graphs (corresponding to the seven variables), the first axis (the horizontal one) appears to separate two groups of various modalities. The first group on the left associates the modalities EC, 1.ATB, and 1.SI; the second group on the right associates the modalities OTHERBRO, BPW, 3.ATB, 0.ATB and 0.SI. Indeed our study shows that (calculations and figures not shown) in respectively 54% and 72% of the cases, BPW and OTHERBRO were used without antibiotic, while one antibiotic is often added to EC basal medium (78%). Moreover, when BPW and OTHERBRO are used, no addition or modification of the selective ingredient concentration is carried out, in respectively 62% and 89% of the cases. However, when EC is used, an addition or a modification of the selective ingredient concentration is observed in 77% of the cases. Indeed, the concentration of bile salts in EC basal medium is often modified (1.12 g l^{-1} instead of 1.5 g l^{-1}).

In the same way, the second axis appears to separate two groups of various modalities. The first one on the bottom associates the modalities non-O157, EC, OTHER-

BRO, D16-24, D6-15, MILK, WATERJU, and MEAT; and the second one on the top associates the modalities O157, BPW, Dsup25, OTHERMAT. In our study, some complementary results support the different oppositions and associations displayed by the second axis. Indeed, these results show firstly that BPW is less frequently used for the isolation of non-O157 (4%) than for the isolation of O157 (21%). Secondly, enrichment of OTHERMAT (other matrixes) seems to be more often associated with the use of BPW (47.5%) than of TSB (29.4%), EC (20.9%) or OTHERBRO (19.6%). Moreover, it appears that a long incubation duration (Dsup25) is more often used for BPW (18%) than for EC (0%), TSB (11%) or OTHERBRO (2.2%).

The MCA plot (Fig. 1) does not display association or opposition between all the modalities of all the variables. For example, TSB has a central position on the plot, which is because of its frequent use for the isolation of STEC regardless of the matrix being analysed. No opposition (whatever the axis considered) is observed between the modalities LowT and HighT. Hence, the incubation temperature does not seem related to the type of serogroup looked for, nor according to the analysed matrix.

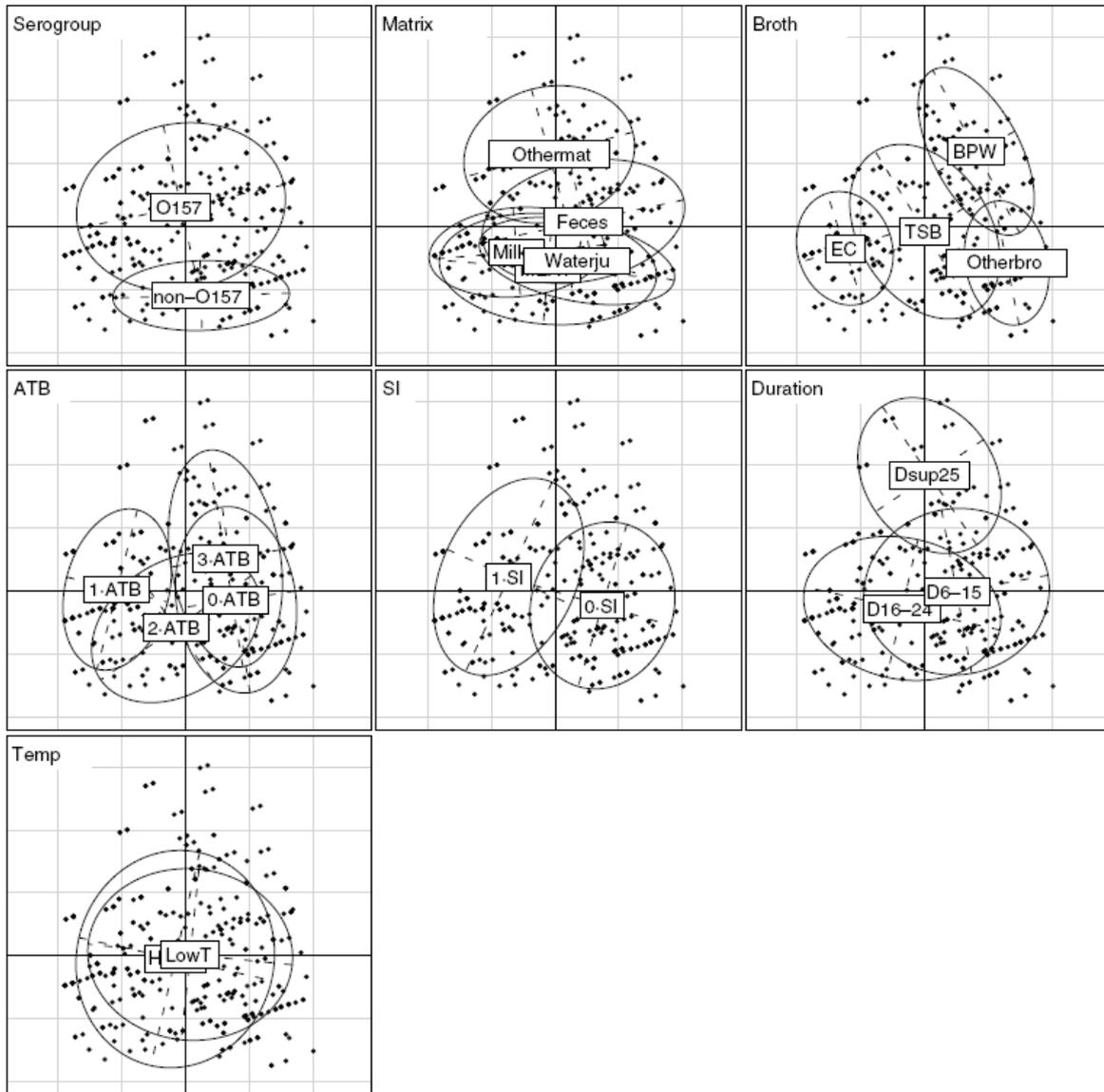


Figure 1 Scatter of the multiple correspondence analysis. Observations and modalities of each variable are represented in a two dimensional plane along the horizontal axis (first axis, inertia = 28%) and the vertical axis (the second axis, inertia = 24%). Variables and their modalities are coded as described in Table 2.

Finally, antibiotics seem to be used regardless of the matrix being analysed and without taking into account the natural background microflora present in each type of samples.

Comparison of the enrichment protocol effectiveness

Among the publications retained in our bibliometric study, some report results from comparative studies deal-

ing with the efficacy of enrichment protocols (McDonough *et al.* 2000; Dodd *et al.* 2003; Lionberg *et al.* 2003; Tutnel *et al.* 2003). The main results of these studies are reported on Table 3. The authors of these publications tested various enrichment protocols on artificially inoculated food or environmental samples. Some of them performed statistical evaluations of the results (via the Mc Nemar test) in order to point out potential differences in efficacy between the various protocols. Tutnel *et al.*

Table 3 Summary of various enrichment protocols and their respective effectiveness

Author	Matrix studied	Screening methods	Number of experiments	Basal medium and selective agents	Incubation factors, h (°C)	Sensitivity (%)	95% confidence intervals of the sensitivity	McNemar Test
Tuteneil	Faeces	Immunological methods	38	TSB + novobiocin	6 (42)	67	0.55–0.77	Yes
			38	TSB + novobiocin	24 (42)	24	0.15–0.35	
			38	BPW	6 (37)	35	0.26–0.45	
			38	BPW	24 (37)	29	0.22–0.39	
Dodd	Bovine feed, faeces	Genetics methods	30	GN	6 (37)	70	0.51–0.85	Yes
			30	GN + cefixime + cefsulodin + V*		86.7	0.69–0.96	
			30	Two successive broths†		80	0.61–0.92	
			40	GN		25	0.13–0.41	
			40	TSB		50	0.34–0.66	
			45	TSB		35.6	0.22–0.51	
			45	TSB + cefixime + vancomycin (V)		44.4	0.30–0.60	
			45	Two successive broths‡		53.3	0.38–0.68	
Lionberg	Ground beef	Genetics methods	33	R&F-EB	6 (42)	72.7	0.54–0.87	No
			33	R&F-EB	24 (42)	96.9	0.84–1.00	
			33	BPW + cefixime + cefsulodin + V	6 (42)	57.6	0.39–0.74	
			33	BPW + cefixime + cefsulodin + V	24 (42)	81.8	0.65–0.93	
			33	mEC + bile salts + novobiocin	6 (42)	66.7	0.48–0.82	
			33	mEC + bile salts + novobiocin	24 (42)	93.9	0.80–0.99	
			15	mEC + bile salts + novobiocin	24 (37)	60	0.32–0.84	
			15	mEC + bile salts + novobiocin	24 (37)	60	0.32–0.84	
Mc Donough	Feces	Biochemical method	24	TSB + vancomycin + cefixime	24 (37)	83.3	0.62–0.95	No
			24	mEC + bile salts + novobiocin		83.3	0.62–0.95	
			24	GN + novobiocin		75	0.53–0.90	

*Vancomycin.

†GN + (GN + cefixime + cefsulodin + vancomycin).

‡TSB + (TSB + cefixime + vancomycin).

(2003) reported that after 6 h of enrichment, TSB with novobiocin detected significantly more positive samples for O157 than BPW. These authors estimated that whatever the methods of screening and enrichment broth used, 6 h of enrichment was significantly better than 24 h of enrichment ($P < 0.05$). Lionberg *et al.* (2003) reported on the contrary (but without statistical comparison), that 24 h enrichment was more effective to detect positive samples in minced beef than 6 h enrichment, regardless of the broths tested. The other studies do not show any significant difference between the protocols. In order to compare the tested detection methods overall, we have reported the sensitivity of each one and its 95% binomial confidence interval (Table 3). These confidence intervals are generally large, because of low number of experiments. Finally, few studies have, to date, compared the efficacy of the different enrichment protocols, and their results diverged depending on the authors.

Discussion

Our results show firstly a large use of TSB (39.3%), EC (25.3%) and BPW (15.6%). The formulation of the EC broth might explain its relatively common use in the

enrichment protocol. Indeed, the bile salts contained in EC (1.5 g l^{-1} ; Vernozy-Rozand and Ray-Gueniot 1997) inhibit the non-*Enterobacteriaceae* strains, which make up a majority of food background microflora. Furthermore, STEC, compared with the other bacteria, are able to ferment the lactose contained in EC, which improves their growth. The different buffers contained in this broth allow the pH to be maintained at around 6.9 which is the optimal pH of O157 according to Nauta and Dufrenne (1999). However, no obvious element in TSB and BPW formulation could explain their large use for the enrichment of STEC. This high frequency of use could be explained by the fact that these two broths are used for the enrichment protocol of various food-borne pathogens (Baird and Lee 1995; Cloak *et al.* 1999) and consequently are also available in the food laboratories for the enrichment of STEC.

Secondly, this present study reports that in 60% of the experiments, an antibiotic is added in the enrichment broth and that novobiocin is the most commonly used antibiotic. Indeed, novobiocin is active mainly against Gram-positive bacteria (especially Gram-positive cocci bacteria; Meyer *et al.* 1995) and against some Gram-negative bacteria frequently present as background microflora in various

samples and could restrict the growth of STEC during the enrichment step. Moreover, STEC are generally resistant to novobiocin, which might also explain its higher use in enrichment broths compared to other antibiotics.

Concerning the temperature and the duration of the incubation period, we point out on the one hand, that the different enrichment broths are often incubated for 16–24 h and on the other hand that they are often incubated at 35 or 37°C. The different broths are often incubated overnight (16–24 h) for practical reasons, which may explain the higher frequency of this duration. We could explain the large use of 35 or 37°C by the impact of the publications of Doyle and collaborators (Doyle and Schoeni 1987) on the microbiologists' community. Indeed, these authors recommended 37°C for the isolation of O157 from food products after an experimental study in 1984 made on one strain, and which showed that O157 had a lower optimal growth temperature (37°C) than other *E. coli*. More recent studies have reported, from experiments on many O157 strains, an average optimal temperature around 40°C (Nauta and Dufrenne 1999; Gonthier *et al.* 2001). In spite of these new results, microbiologists often continue to use 37°C as incubation temperature, perhaps from force of habit or technical reasons; or as a precaution because little knowledge has been yet reported about non-O157 optimal growth temperature.

Furthermore, the MCA plot shows that the incubation temperature does not seem related to the type of serogroup looked for. The MCA shows that antibiotics are used regardless of the matrix being analysed and therefore without taking into account the natural background microflora present in each type of samples. Yet, it seems important to adapt the addition of antibiotic to the background microflora, because the goal of the enrichment step is to ensure the growth of STEC while limiting the growth of background microflora.

In fact, some researchers have tried to optimize this enrichment step, by testing and comparing various protocols. Nevertheless, the results diverged and were neither convincing nor statistically satisfactory. Indeed, with a small number of experiments the authors quoted above found mainly large confidence intervals, and it is therefore difficult to demonstrate significant differences between two methods. In addition, it seems to be quite difficult to compare these studies to each other as concerns the efficacy of the various enrichment protocols. Indeed the authors in the first place, did not use the same screening method (which could influence the final results) and in the second place, did not take into account the strain related behaviour. Thus, the strains chosen for comparative studies of STEC enrichment protocols are not always pre-adapted to the sample in which they were

inoculated (McDonough *et al.* 2000; Cui *et al.* 2003; Dodd *et al.* 2003). Therefore, in the studies carried out by these authors, the growth parameters of O157 could be different from one strain to another.

As a result, no clear conclusion could be drawn currently about the efficacy of enrichment protocols. Hence, studies must be conducted in order to assess their efficacy, but incorporating a large number of experiments and with various serotypes of STEC. Moreover, a description of the interaction between STEC and the background microflora in various environmental or food matrices could be also interesting to carry out, in order to understand and then optimize the enrichment step effectiveness.

Acknowledgements

We thank Mrs Servane ROZE for providing a part of the papers included in the bibliometric study. We thank also Mrs Marie Cornu and Mrs Valérie Livrelli for their constructive councils, Mr Richard Sullivan and Annie Raymond-Lemée for their coaching in English. This work is supported by the French Food Safety Agency (AFSSA; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France).

References

- Al-Gallas, N., Ben Aissa, R., Attia Annabi, Th., Bahri, O. and Boudabous, A. (2002) Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. *Food Microbiol* **19**, 389–398.
- Baird, R. and Lee, W.H. (1995) Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* **26**, 15–24.
- Bhaduri, S. and Cottrell, B. (2001) Sample preparation methods for PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on beef chuck shoulder using a single enrichment medium. *Mol Cell Probes* **26**, 70–74.
- 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.
- Catarame, T.M.G., O'Hanlon, K.A., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2003) Optimisation of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *J Appl Microbiol* **95**, 949–957.
- Cloak, O., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (1999) Isolation and detection of *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* and *Yersinia spp.* using a simultaneous enrichment step followed by a surface adhesion immunofluorescent technique. *J Microbiol Methods* **39**, 33–43.

- Cui, S., Schroeder, C., Zhang, D. and Meng, J. (2003) Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Appl Microbiol* **95**, 129–134.
- Dodd, C., Sanderson, M., Sargeant, J., Nagaraja, T., Oberst, R., Smith, R. and Griffin, D. (2003) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in Midwestern feedlots. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5243–5247.
- Doyle, M. and Schoeni, J. (1987) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2394–2396.
- Foster, G., Hopkins, G., Gunn, G., Ternent, H., Thomson-Carter, F., Knight, H., Graham, D., Edge, V. et al. (2003) A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* O157 from bovine faeces. *J Appl Microbiol* **95**, 155–159.
- Gonthier, A., Guérin-Faubleé, 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.
- Grant, M. (2004) Improved laboratory enrichment for enterohemorrhagic *Escherichia coli* by exposure to extremely acidic conditions. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1226–1230.
- Hepburn, N., MacRae, M., Johnston, M., Mooney, J. and Ogden, I. (2002) Optimizing enrichment conditions for the isolation of *Escherichia coli* O157 in soils by immunomagnetic separation. *Lett Appl Microbiol* **34**, 365–369.
- Ibekwe, A. and Grieve, C. (2003) Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **94**, 421–431.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comp Graph Stat* **5**, 299–314.
- Li, Y. and Mustapha, A. (2004) Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR. *J Food Prot* **67**, 27–33.
- Lionberg, W., Restaino, L., Frampton, E. and Barbour, W. (2003) Efficacy of enrichment broths in the recovery of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef by PCR. *J Food Prot* **66**, 1911–1915.
- McDonough, P., Rossiter, C., Rebhun, R., Stehman, S., Lein, D. and Shin, S. (2000) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York state and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. *J Clin Microbiol* **38**, 318–322.
- McKee, R., Madden, R. and Gilmour, A. (2003) Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments. *J Food Prot* **66**, 1576–1580.
- Meyer, A., Deiana, J. and Leclerc, H. (1995) *Cours de microbiologie générale*. Paris: Jouve.
- 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.
- Shinagawa, K. (1997) Correspondence and problem for *Enterohemorrhagic E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* **46**, 104–112.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. and Olivier, J.M. (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* **7**, 75–83.
- Tutenel, A., Pierard, D., Hoof, J.V. and Zutter, L.D. (2003) Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. *J Food Prot* **66**, 1564–1569.
- Vernozy-Rozand, C. and Ray-Gueniot, S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7 et *Escherichia coli* Verotoxiques: particularités physiologiques, biochimiques, méthodes d'isolement et de détection dans les aliments. *Méd Vét* **2**, 148.

3. Détection des STEC et de *E. coli* O157:H7

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses méthodes pour détecter *E. coli* O157:H7 et les STEC à partir de matrices plus ou moins complexes. Ces différentes techniques peuvent être classées en méthodes phénotypiques et méthodes génétiques. Un accent particulier sera également mis sur les limites de ces méthodes ainsi que sur l'émergence de méthodes nouvelles et originales.

3.1. Méthodes phénotypiques

3.1.1 Détection de *E. coli* O157:H7

3.1.1.1 Utilisation des 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). Néanmoins, il a été montré dans diverses études que des souches STEC du sérotype O157:H7 étaient capables de fermenter le sorbitol en 24 heures (Morgan et al., 1993; Moxley et Francis, 1986; Wilson et al., 1992). La prévalence de ces souches particulières est actuellement peu connue mais il apparaît évident que de telles souches ne peuvent être mises en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments, telles qu'elles seront décrites dans ce chapitre. 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).

Toutes ces caractéristiques biochimiques particulières ont été ré-utilisées dans la conception de divers milieux électifs et sélectifs vis à vis du sérotype O157:H7.

L'absence de fermentation du sorbitol a, par exemple, justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC) qui a, qui plus est, subi plusieurs modifications dans l'objectif d'augmenter le caractère sélectif vis-à-vis de O157:H7. Ainsi, 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⁻¹ à une gélose SMAC 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.

Enfin, Zadik et al., (1993) ont décrit l'intérêt d'ajouter du tellurite et de la céfixime à cette gélose SMAC (CT-SMAC), étant donné des concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus élevées pour les STEC O157 que pour les autres *E. coli* et les bactéries sorbitol négatives comme *Aeromonas* et *Plesiomonas*. Néanmoins, des souches de *E. coli* O157:H7 sensibles à certaines concentrations de tellurite ont été décrites par Karch et al. (1996) et l'utilisation de la gélose CT-SMAC dans ce cas précis s'avère inadaptée.

De plus, 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). De nombreux milieux chromogènes ont par ailleurs été mis au point comme par exemple les milieux CHROMagar *E. coli* O157:H7 (CHROMagar) et O157:H7 ID (bioMérieux) spécifiques du sérotype O157:H7.

Ainsi les méthodes biochimiques sont intéressantes et fondamentales pour la détection de *E. coli* O157:H7 mais restent inadaptées à la détection des souches « mutantes » du sérotype O157:H7 et surtout à la détection des STEC non-O157:H7, étant donné l'absence de propriété biochimique commune à tous les STEC.

3.1.1.2 Tests immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7

Il existe actuellement sur le marché un grand nombre de tests permettant la détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments et/ou dans les échantillons environnementaux. Ces systèmes comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés (Tableau XIII). Ces nombreux tests (comme évoqué dans la Partie 2) sont précédés, compte tenu de leur faible sensibilité, par une phase d'enrichissement.

TEST	FABRICANT	ANTIGÈNE(S) CIBLE(S)	SYSTEME DE REVELATION	FORMAT	VALIDATION
EHEC-Tek™	Organon Teknika	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	Health Canada Method MRLP-91
Tecra™ E.C. O157 VIA	Biotrace International	O157	Colorimétrique	Microplaque	
Assurance™ EHEC EIA	BioControl Systems Inc.	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	AOAC Official Method 996.10
PATH-STIK E. coli 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 E. coli O157	Diffchamb	O157	Colorimétrique	1 étape	
REVEAL™ E. coli O157:H7	Neogen	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
ImmunoCard Stat1 E. coli O157:H7	Meridian Diagnostics	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	AOAC Performance Tested
Biocard EHEC	ANI Biotech OY	O157	Colorimétrique	1 étape	
Singlepath™ E. coli O157:H7	Merck Ltd	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
VIDAS E. coli O157	bioMérieux	O157	Fluorescent	Automatisé	AFNOR 12/08- 07/00
EiaFoss E. coli O157	Foss Electric A/S	O157	Fluorescent	Automatisé	
Difco EZ coli	Becton Dickinson	O157	Colorimétrique	1 étape	
NOW EH. E. coli	Binax, Inc	O157 O157:H7	Colorimétrique	1 étape	
E. coli O157-CD	Denka Seiken	O157	-	-	
RapidChek for E. coli O157:H7	SDI, Inc	O157:H7	Colorimétrique	1 étape	
EC Lite	GEM Biomedical	O157	Chemiluminescence	1 étape	
Captivate O157	IDG, Lab M Ltd.	O157	-	-	
E. coli Rapitest	Kalix	O157	-	-	
Premier EHEC	Meridian Diagnostics	O157	Colorimétrique	1 étape	
GeneQuence	Neogen	O157:H7	Colorimétrique	Microplaque	
BioGem	Xenith BioMed	O157	Colorimétrique	1 étape	

Tableau XIII : Kits immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment.

✓ Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA/ELFA

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). 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. Une grande partie de ces systèmes est basée sur le principe d'immuno-chromatographie. 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 signant la présence probable de *E. coli* O157 dans l'aliment. On peut citer en exemple le test validé AOAC « VIP EHEC » (BioControl, Montesson, France) qui permet, après un enrichissement de 18h (8h pour la matrice steak haché), de visualiser (en 10 minutes) si un échantillon donné est contaminé ou non par *E. coli* O157:H7 (Photo 5).

Pour les systèmes ELISA, les anticorps spécifiques de *E. coli* O157:H7 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 "révélateur" 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 5.10^4 à 5.10^5 *E. coli* O157.ml⁻¹ de bouillon d'enrichissement.

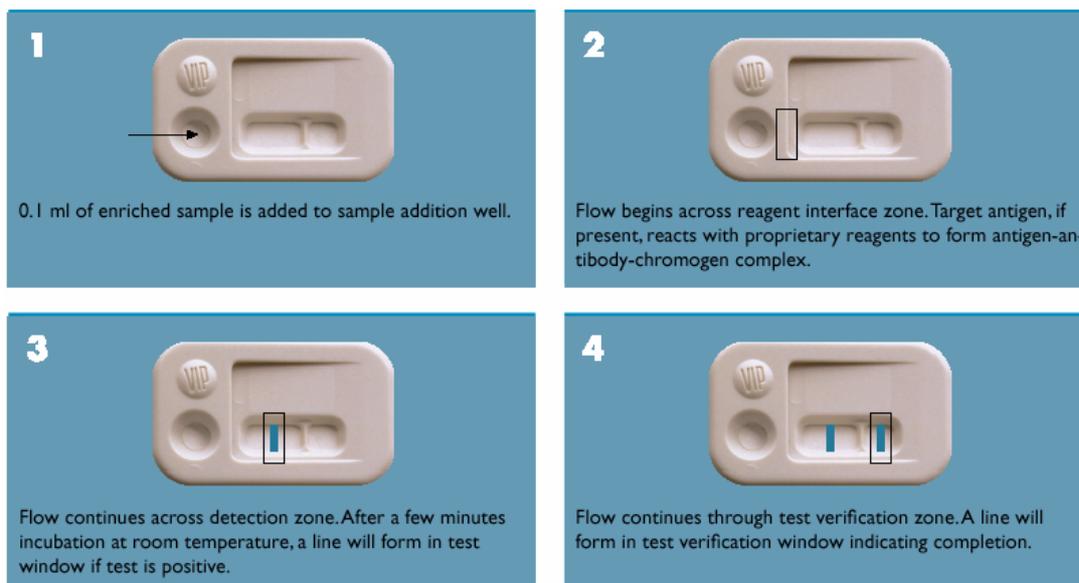


Photo 5 : VIP test, test immunologique en « 1 étape ».

✓ Systèmes automatisés

L'éventail des méthodes immunologiques totalement automatisées est beaucoup plus restreint (Tableau XIII). Il a été choisi ici de présenter le système VIDAS *E. coli* O157 (VIDAS ECO) qui a été utilisé par la suite dans l'étude sur l'optimisation de la recherche des STEC O157 dans le steak haché (cf. Chapitre 3 du Mémoire Expérimental).

Le VIDAS ECO est un test immunoenzymatique permettant la détection d'antigènes somatiques O157 par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Fluoresent Assay) grâce au système automatisé VIDAS. Ce système permet de détecter *E. coli* O157 dans les aliments après un double enrichissement de 30 heures (Figure 11). Ce kit 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 pipetage, dont la face interne est recouverte d'anticorps anti-O157, et une barrette contenant les solutions de lavage et de révélation (cf. ANNEXE VIII).

Une aliquote de 500 µl de bouillon d'enrichissement placée dans la barrette subit des cycles d'aspiration-refoulement. Les antigènes somatiques O157 potentiellement présents dans ce bouillon sont alors captés par les anticorps du cône. Les éléments restés libres sont ensuite éliminés grâce à plusieurs lavages. En phase finale, des anticorps marqués à la phosphatase alcaline sont aspirés et refoulés dans le cône et vont ensuite se fixer sur les antigènes O157, eux-mêmes fixés sur les anticorps de la paroi du cône. De nouvelles étapes de lavage éliminent les conjugués non fixés. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyle-

ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyl-ombelliféron) dont la fluorescence émise (RFV, Relative Fluorescence Value) est mesurée à 450 nm.

Cet automate peut réaliser jusqu'à 30 analyses simultanément et permet de réaliser d'autres recherches de pathogènes et/ou toxines (e.g. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, entérotoxine staphylococcique).

L'ensemble des systèmes décrits précédemment (systèmes en microplaques, en une étape ou automatisés) permet aux industriels de l'agroalimentaire un contrôle "présomptif" de la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments analysés. En effet, 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. Un résultat positif de l'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* peuvent être fréquentes lors de l'analyse de certaines matrices (e.g. viande). 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. A noter que 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.

Ainsi, dans le cas d'un résultat positif, il y a nécessité de confirmer la présence du pathogène dans l'échantillon en isolant et identifiant la bactérie à l'origine du signal positif. Une présentation des deux protocoles actuellement validés par l'AFNOR pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les aliments (détection et isolement des colonies suspectes) fait l'objet du paragraphe suivant.

✓ Protocoles de recherche de *E. coli* O157 dans l'aliment, validés AFNOR

Les industriels de l'agroalimentaire ont donc à leur disposition de nombreux outils immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments mais une préférence doit toutefois être accordée à des tests officiellement validés (i.e. AFNOR, ISO, AOAC) afin de prendre un risque minimum dans la gestion du devenir de lots considérés suspects.

En France, les deux méthodes validées AFNOR de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment utilisent soit :

- ➔ La technique de la séparation immuno-magnétique [IMS] (ISO EN 16654) (Figure 10)
- ➔ Le système VIDAS ECO (ISO EN 16140) (Figure 11)

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. Les colonies caractéristiques sont ensuite confirmées à l'aide de tests biochimiques (galeries API, bioMérieux) et immunologiques (test d'agglutination latex O157, recherche des Shiga-toxines par ELISA).

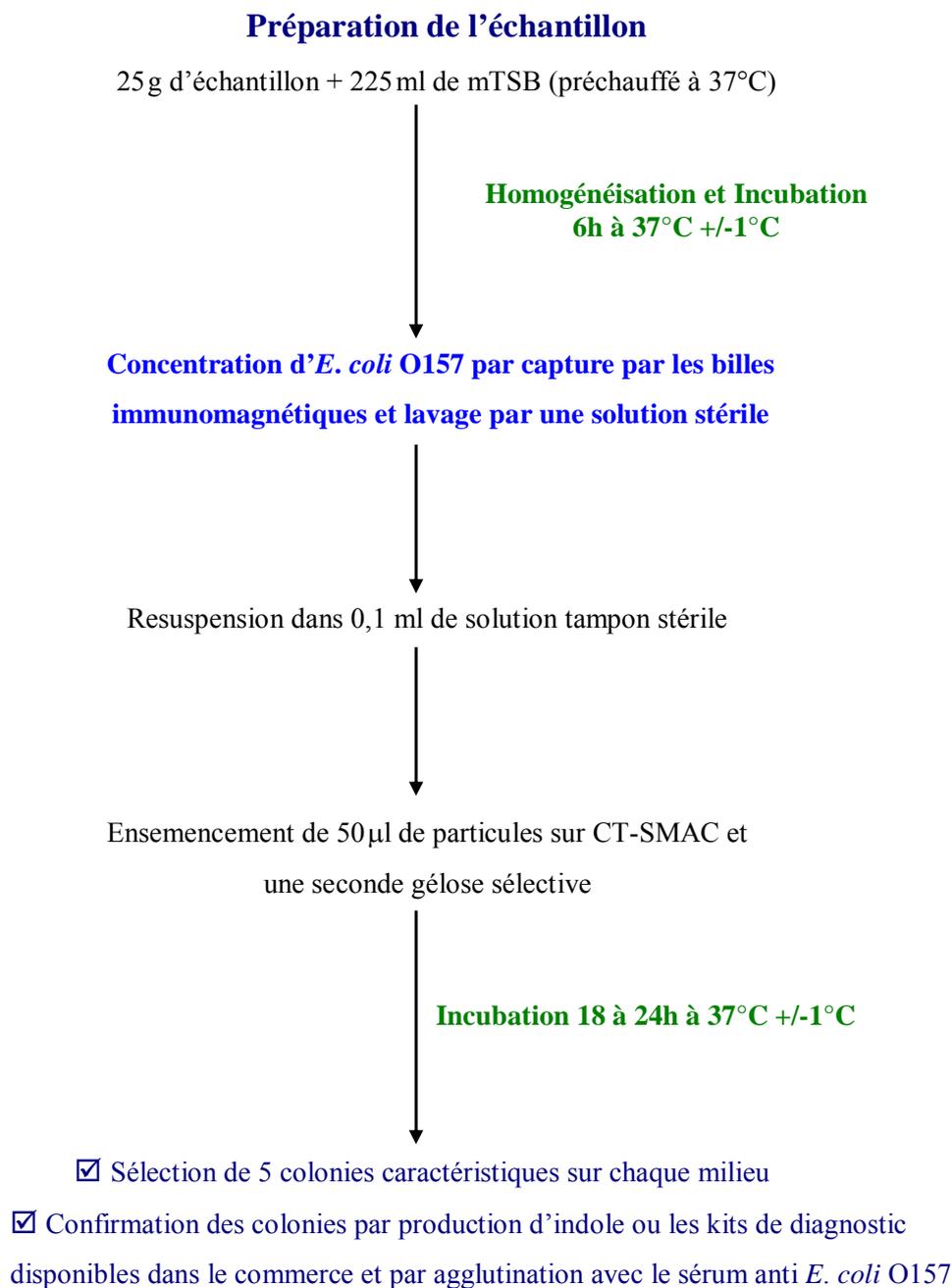


Figure 10 : Mode opératoire de l'IMS (ISO EN-16654).

Pour la méthode VIDAS ECO, un double enrichissement de l'échantillon alimentaire est (comme évoqué précédemment) premièrement réalisé dans du mTSB (modified Trypticase Soya Broth) pendant 6h à 42°C puis dans du CT-MacConkey Broth pendant 24h à 37°C. Une aliquote du bouillon d'enrichissement est ensuite analysée par le système VIDAS ECO. 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 qui sont ensuite relarguées sous forme d'un immunoconcentrat et peuvent être isolées sur des géloses spécifiques. Les colonies suspectes font, là encore, l'objet de confirmation (agglutination latex O157, identification de l'espèce, recherche de l'antigène H7, production de Shiga-toxine(s)).

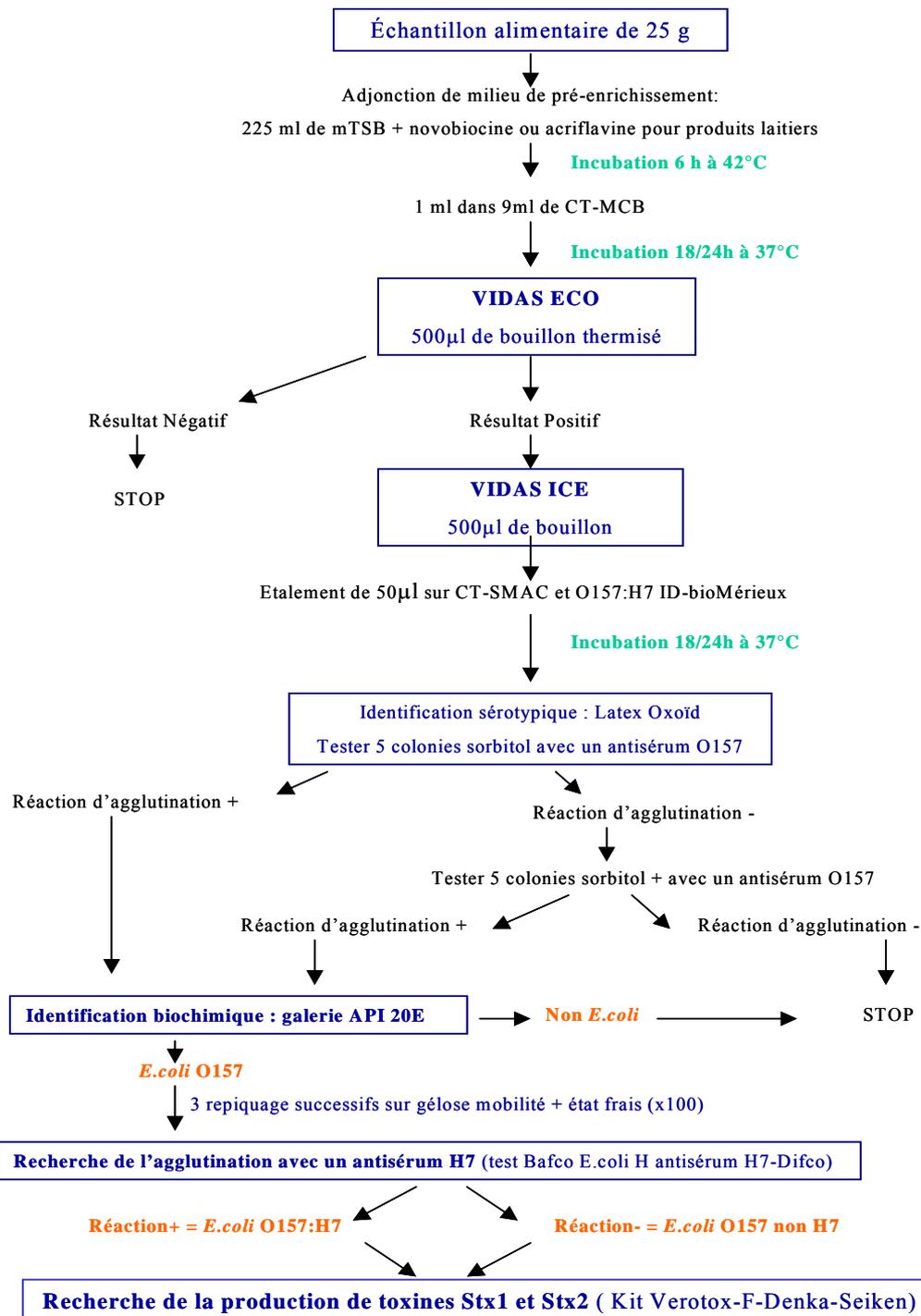


Figure 11 : Protocole de recherche de *E. coli* O157 dans l'aliment : méthode VIDAS ECO.

3.1.2 Détection des STEC

3.1.2.1 Utilisation de l'effet cytopathogène des Shiga-toxines

Ces tests sont des alternatives à la méthode de référence de recherche des Shiga-toxines (i.e. Verotoxines). Celle-ci est fondée sur la mise en évidence du pouvoir cytopathogène des Verotoxines sur les lignées cellulaires Vero (Richardson et al., 1988). Ainsi, des échantillons fécaux, des cultures cellulaires et des aliments peuvent être testés (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 circulaire et se détachent les unes des autres en présence de Verotoxines. Dans des études récentes, la croissance des STEC dans des milieux dépourvus de fer a permis la production accrue de Stx1, mais pas de Stx2 (Thomas et al., 1993). Pour les tests de routine, les concentrations de Verotoxines obtenues dans les bouillons décrits plus haut sont suffisantes. Une grande quantité des Verotoxines reste liée à la bactérie et n'est par conséquent pas libérée dans les milieux. Elle peut toutefois être relarguée par sonication, par 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 Verotoxines (Proulx et al., 1992). Du fait d'un seuil de sensibilité très bas, nécessaire à la détection des Verotoxines 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 Verotoxines libres. (Igarashi et al., 1987; Proulx et al., 1992).

3.1.2.2 Tests immunologiques de détection des STEC dans l'aliment

Pour confirmer que l'effet cytopathogène exercé sur les cellules Vero est effectivement dû aux Verotoxines, 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 Verotoxines ont été décrites (Beutin et al., 1989; Chapman et al., 1992; Keene et al., 1993). Les systèmes permettant la fixation des Verotoxines 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-Verotoxines 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 antigénités variables, une grande vigilance doit exister pour le choix des réactifs lorsque l'on se propose de détecter toutes les Verotoxines dans un échantillon (Smith et al., 1993).

Depuis peu, quelques kits ont été commercialisés, permettant la détection des Verotoxines 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 Verotoxines (Beutin et al., 1996). Enfin, 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 et al. (1999).

L'élaboration et/ou la validation d'autres tests est actuellement en cours et est d'autant plus motivée et accélérée par l'émergence d'autres sérotypes que O157:H7 (O26, O148) récemment incriminés dans des épidémies. En effet, les industriels de l'agro-alimentaire affichent à l'heure actuelle un réel besoin de pouvoir détecter tous les STEC dans leurs produits avant commercialisation.

3.2 Méthodes génétiques de détection des STEC

3.2.1 Détection des gènes *stx*

La détection des gènes *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) codant la production de Shiga-toxines s'effectue soit directement sur le génome total (hybridation de sondes ADN), soit après amplification d'une partie des gènes recherchés (PCR). Cette méthode reste la méthode par excellence pour la détection des STEC puisque la seule caractéristique commune à l'ensemble des STEC est, par définition, la présence d'un gène *stx*.

3.2.1.1 Hybridation ADN-ADN et sondes oligonucléotidiques

Le principe de la méthode repose sur la propriété qu'ont les chaînes d'acides nucléiques simple brin de ne s'hybrider qu'avec des fragments de séquences complémentaires. Elle utilise également la propriété de l'ADN à se fixer sur des supports membranaires de nitrocellulose.

La possibilité de cloner les gènes *stx1* et *stx2* a permis de développer des sondes ADN pour détecter les STEC (Karch et Meyer, 1989, Newland et Neill, 1988). Initialement, ces sondes étaient marquées avec un isotope radioactif (^{32}P ou ^{35}S).

Karch et Meyer (1989) ont utilisé 4 oligonucléotides correspondant à 4 régions différentes du gène *stx1* et un oligonucléotide (41 bases) dérivé du gène *stx2* d'une souche de *E. coli* O157:H7. Cinquante isolats appartenant à 5 sérotypes différents de STEC ont été détectés par hybridation sur colonie. Parallèlement, aucune réaction faussement positive n'a été décelée avec 416 souches de *E. coli* connues pour être non verotoxinogènes. Les 4 sondes dérivées de *stx1* ont toutes hybridé avec les souches qui synthétisaient Stx1 seule et les souches du sérotype O157:H7, coexprimant Stx1 et Stx2. Ces résultats suggéraient que les régions choisies pour la fabrication des sondes étaient très conservées entre souches. Cette méthode d'hybridation sur colonie pourrait donc servir de test spécifique et sensible avec possibilité de diagnostic.

Tous ces procédés étaient à la fois sensibles et spécifiques et l'utilisation de lavages avec des conditions stringentes permettaient même la différenciation entre les souches possédant *stx1*, *stx2* ou les deux. Cependant, l'utilisation de sondes marquées radioactivement n'est pas sans poser de nombreux problèmes : résultats obtenus après un temps trop long (nécessité d'un temps élevé d'exposition des autoradiogrammes), temps de demi-vie court des sondes et surtout problèmes associés à la manipulation et à l'obtention des radio-isotopes. L'ensemble de ces problèmes a toutefois été résolu, sans perte de sensibilité ou de spécificité, grâce à la mise au point de sondes non-radioactives marquées à la digoxigénine ou la biotine, avec révélation par réaction enzymatique colorée (Thomas et al., 1991).

3.2.1.2 PCR (Polymérase Chain Reaction)

Ces méthodes sont, la plupart du temps, basées sur la recherche des gènes *stx* par PCR (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000) et les amorces conseillées ont été décrites par Lin et al. (1993). L'utilisation de la PCR pour détecter les STEC s'est développée au cours des 10 dernières années mais le premier système a été mis au point dès 1989 par Karch et Meyer

avec des amorces "dégénérées" (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 verotoxinogènes (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 et *Shigella dysenteriae* type 1 était la seule autre bactérie détectée. La sensibilité de cette méthode était de 1 pg d'ADN ou 17 UFC.

Néanmoins, 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 avec pour certains une étape de dilution des échantillons (Venkateswaran et al., 1997 ; Begum et Jackson, 1995) ou d'incubation sur matrice inorganique (Fagan et al., 1999) afin de réduire la concentration des composés inhibant la polymérase. Par ailleurs, de récentes techniques d'extraction optimisées ont été mises au point. On peut citer l'exemple de la technologie BOOM[®] (Boom et al., 1990) permettant, grâce à des supports magnétiques de silice, d'extraire, de purifier et de concentrer de façon automatisée les acides nucléiques à partir de divers échantillons.

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.

Plusieurs auteurs ont décrit 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 toutefois pas des systèmes intégrés de lecture de fluorescence en temps réel (Oberst et al., 1998).

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) et simple a été testée sur 23 souches de STEC et 38 extraits fécaux de patients et s'est révélée 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.

3.2.2 Détection des gènes spécifiques du sérotype *E. coli* O157:H7

Contrairement aux méthodes de différenciation basées sur les caractéristiques biochimiques (fermentation du sorbitol et activité de la β -glucuronidase), les méthodes génétiques ne s'appuient pas sur les activités enzymatiques et ne sont donc pas affectées par le type de milieu utilisé, l'émergence de mutants biochimiques ou encore la présence de bactéries non ciblées (e.g. *E. hermannii*) ayant des phénotypes très proches (Vernozy-Rozand et Ray-Gueniot, 1997).

Les gènes *uidA* (codant la β -glucuronidase), *eae* (codant l'intimine) et *fliC* (codant la flagelline) peuvent être détectés seuls ou en combinaison avec les gènes *stx* (PCR multiplex).

3.2.2.1 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. Feng (1995) a ensuite 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 (souches pathogènes atypiques isolées en Allemagne chez des patients souffrant de SHU (Gunzer et al., 1992)).

Qui plus est, en combinant la détection simultanée de plusieurs gènes, plusieurs équipes (Cebula et al., 1995 ; Venkateswaran et al., 1997) ont mis au point des PCR multiplex permettant d'identifier spécifiquement *E. coli* O157:H7 (e.g., PCR multiplex MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay)).

3.2.2.2 Détection du gène *eae*

Le gène *eae* code l'intimine, protéine responsable de l'association des EHEC et des EPEC avec la membrane cytoplasmique de certaines cellules. La partie située en 5' du gène *eae* est relativement conservée entre les EHEC et les EPEC ; en revanche, le premier tiers à l'extrémité 3' diffère entre les sérotypes des EHEC et des EPEC (Beebakhee et al., 1992).

Deng et Fratamico (1996) ont décrit une PCR multiplex pour amplifier simultanément 3 séquences d'ADN différentes de *E. coli* O157:H7 : un fragment spécifique du gène *eae*, une séquence conservée entre *stx1* et *stx2* et un fragment du plasmide de 60Mda (plasmide présent chez tous les EHEC, codant certains facteurs de virulence comme les fimbriae et des entérohémolysines). Comme la PCR multiplex MAMA évoquée précédemment, cette PCR multiplex permet de différencier les *E. coli* O157:H7/NM des autres STEC et de mettre en évidence les organismes possédant l'un des gènes ciblés.

3.2.2.3 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. De plus, afin de 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*.

Enfin, pour rendre plus facile la détection de *E. coli* O157:H7, Gannon et al. (1997) ont réalisé une PCR multiplex avec des amorces pour les gènes *fliC*, *stx1*, *stx2* et *eae*.

3.2.2.4 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*. 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 *stx1* et *stx2*. L'avantage de cette technique réside dans le pouvoir de différencier non seulement *E. coli* O157:H7/NM des autres STEC **mais également les souches O157:H7 productrices de Shiga-toxines des souches O157:H7 non-productrices. Cette différenciation permet ainsi d'apprécier le caractère dangereux des aliments contaminés par ces souches.**

A noter enfin que Fortin et al. (2001) ont décrit un système de PCR en temps réel basé sur la détection du gène *rfb* permettant la détection de tous les *E. coli* de séro groupe O157.

3.2.3 Application en Industries Alimentaires des méthodes génétiques

Bien que les méthodes génétiques soient apparues récemment en agro-alimentaire, leur impact a été rapide et important. Un grand nombre de protocoles a été développé pour détecter les agents pathogènes dans les aliments et notamment *E. coli* O157:H7.

Citons l'exemple de deux kits de détection de *E. coli* O157:H7 actuellement disponibles sur le marché. 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 :

① **Le kit BAX[®] (AOAC 050501) for screening/*E. coli* O157:H7 (Qualicon, Inc. – USA)**

Ce kit 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 un enrichissement en milieu (préchauffé) BAX system[®] en 8 heures à 42°C d'échantillons de steak haché volontairement contaminés, ce système permet de détecter moins de 4 UFC/65g (Anonyme, 2005).



Photo 6 : Kit BAX-Qualicon.

② **Le kit Probelia[™] PCR System-*E. coli* O157:H7 (Bio-Rad, laboratories - USA)**

Ce kit 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 spp* et *Shigella spp*).

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).



Photo 7 : Kit Probelia – BioRad.

Les méthodes génétiques ont une très grande sensibilité et une spécificité souvent supérieures 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 très intéressantes pour détecter les *E. coli* verotoxiques 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 l'investissement en matériel et en formation du personnel relativement conséquent.

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".

3.3. Limites des méthodes

De nombreux auteurs considèrent aujourd'hui que les STEC peuvent entrer dans une forme viable non cultivable (VNC) suite à des stress où interviennent des modifications des fonctions physiologiques et notamment une division cellulaire altérée (Colwell et al., 1985). Si ce changement intervient dans l'aliment, il s'avère alors difficile d'isoler ensuite les bactéries VNC en utilisant les méthodes de détection et d'isolement habituelles. Il faut cependant souligner que certaines nouvelles méthodes permettent aujourd'hui la revivification de souches VNC.

Par ailleurs, Whiting et Bagi (2002) ont montré que les cellules bactériennes stressées (stress thermique, mécanique, dessiccation...) ont un temps de latence (λ , lag) plus élevé que des souches non stressées. Ainsi, en considérant les seuils de détection (sans enrichissement) des différentes méthodes de screening (environ 4 à 5 \log_{10} UFC.g⁻¹ pour l'IMS (Gehring et al., 2004) et 3 \log_{10} UFC.g⁻¹ pour la PCR (Cui et al., 2003)), des résultats faussement négatifs pourraient alors être potentiellement obtenus, notamment après une phase d'enrichissement de courte durée (e.g. 6h dans le cas de l'IMS). L'influence d'un stress par le froid sur la durée de l'enrichissement avait d'ailleurs été étudiée par Uyttendaele et al. (1998), avant détection par PCR de STEC volontairement ensemencés dans de la viande de bœuf. Des temps d'incubation de 6 et 9 heures étaient respectivement suffisants pour détecter des inoculums de 1 à

10 UFC.g⁻¹ et de 1 à 10 UFC/25g, 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 car, dans ces conditions, un enrichissement plus court de 9 heures augmentait le seuil de détection de la PCR à 80 UFC.g⁻¹.

D'autre part, dans le cas de souches stressées, Blackburn et McCarthy (2000) ont montré que l'utilisation d'un enrichissement sélectif conduisait à l'obtention de « faux négatifs » et ont préconisé l'emploi au préalable d'un milieu de pré-enrichissement non sélectif.

Il s'avère intéressant de noter que l'industrie du diagnostic tente aujourd'hui de concevoir des techniques de screening présentant des seuils de détection avant enrichissement plus faibles que ceux des méthodes génétiques ou immunologiques habituellement rencontrées sur le marché.

3.4. Nouvelles méthodes et méthodes originales de détection des STEC et de E. coli O157:H7

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 forcément 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 (i.e. Reverse-Transcriptase PCR) mais également la méthode NASBA (Nucleic Acid Sequenced Based Amplification) (Chan et Fox, 1999 ; Simpkins et al., 2000) pourrait constituer un moyen très intéressant pour détecter rapidement les pathogènes viables, et notamment les STEC (McIngval et al., 2002).

Dans la RT-PCR il y a deux étapes. L'ARN est d'abord transformé en ADNc, soit à l'aide d'amorces hexanucleotides aléatoires, soit plus souvent d'amorces spécifiques. Cet ADNc est ensuite amplifié par PCR. 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. McIngval 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.

La méthode NASBA est une technologie d'amplification isotherme (41°C) de l'acide nucléique reposant sur l'action conjointe de trois enzymes (transcriptase inverse AMV-RT, Rnase-H et polymérase-ARN T7). Associée à des amorces oligonucléotidiques spécifiques d'une cible, elle amplifie les cibles ARN plus d'un milliard de fois en 90 minutes. La technologie NASBA en temps réel de bioMérieux semble plus sensible que la RT-PCR (Keer et Birch, 2003) et présente des avantages évidents en termes de délai d'obtention des résultats et de facilité d'utilisation.

D'autres méthodes de détection « originales » récentes comme le screening de *E. coli* O157:H7 par PEMC (Piezoelectric excited millimeter-sized cantilever sensors) (Campbell et al., 2006) ou encore par ELIMCL (Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescence) (Gehring et al., 2004) sont également proposées dans la littérature. Ces nouvelles méthodes nécessitent néanmoins d'être évaluées.

MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL...

Modélisation de la croissance en vue d'une optimisation de la phase d'enrichissement

Publications n°2 et 3

Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, C. Lazizzera, C. Bavai, and M.-L. Delignette-Muller

Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 261–268

Growth of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand, M.P. Montet, C. Bavai, B. Fremaux and M.-L. Delignette-Muller

Veterinary Microbiology, 2007, *In Press*

Résultats non publiés

Croissance de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe du lait cru pour différents protocoles d'enrichissement testés

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, C. Bavai, and M.-L. Delignette-Muller

1. But de ces trois études

L

Les expérimentations présentées dans ce 1^{er} chapitre constituent l'étape N°1 de notre étude, à savoir « **L'Optimisation de l'étape d'enrichissement** ». Il s'agissait plus précisément d'apprécier les effets de différents facteurs et de la flore annexe de l'échantillon considéré sur la croissance de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7. Les différents facteurs étudiés correspondent aux principaux facteurs d'enrichissement mis en évidence dans la publication N°1 : le milieu d'enrichissement (TSB et EC), la présence ou l'absence de novobiocine dans le milieu (N+ ou N-) et la température d'incubation (37°C et 40°C). Un suivi et une modélisation de la croissance simultanée de *E. coli* O157:H7 [O157] (ou des STEC non-O157:H7) et de la flore annexe de trois matrices ont ainsi été réalisés afin de visualiser les effets potentiels des divers facteurs d'enrichissement cités précédemment. Les matrices investiguées correspondent, d'une part, à deux aliments majoritairement incriminés dans les épidémies : le **steak haché** et le **lait cru** et, d'autre part, à une matrice environnementale directement ou indirectement impliquée dans la contamination d'aliments ou d'eaux de boisson et de baignade : les **fèces de bovins**.

Une présentation des modalités de chaque expérimentation est tout d'abord réalisée, avant d'évoquer et de comparer dans un second temps les résultats concernant chacune de ces trois matrices.

2. Matériels et méthodes

Dans un souci de concision, cette partie « Matériels et Méthodes », quasi analogue pour les trois études (**Etude N°1, Matrice « steak haché » ; Etude N°2, Matrice « fèces de bovins » ; Etude N°3, Matrice « lait cru »**) sera présentée de manière globale.

Huit protocoles d'enrichissement, correspondant aux croisements des modalités des trois facteurs étudiés (milieu, novobiocine et température), ont ainsi été testés : TSB.N+.37°C, TSB.N+.40°C, TSB.N-.37°C, TSB.N-.40°C, EC.N+.37°C, EC.N+.40°C, EC.N-.37°C, EC.N-.40°C (cf. Table 2, Publication N°2). Pour ces 8 protocoles, un suivi simultané de la croissance de chacune des souches de STEC (O157 ou non-O157) inoculées et de la flore annexe de chaque type d'échantillon (steak haché, lait et fèces) étudié a été mené toutes les 2 heures de 0 à 24h.

Plus précisément dans l'étude N°1, la croissance de 4 souches de *E. coli* O157:H7 inoculées individuellement (cf. Table 1, Publication N°2) a été étudiée simultanément à celle de la flore annexe du steak haché. De même, un suivi simultané de la croissance de deux de ces quatre souches (les souches 2 et 4) et de la flore annexe du lait cru a été réalisé dans l'Etude N°3. Enfin, la croissance de deux souches de STEC non-O157:H7 (isolées de fèces de bovins laitiers) et de la flore annexe de fèces de bovins a également fait l'objet d'un suivi simultané (Etude N°2).

Les souches de STEC (O157 ou non-O157) ont été inoculées à une concentration de $3 \log_{10}$ UFC/25g d'échantillon (steak haché, lait et fèces) afin d'observer au moins une colonie par boîte au 1^{er} temps de prélèvement. A noter que les 2 souches de STEC non-O157 ont été génétiquement modifiées avec insertion d'un plasmide portant un gène de fluorescence pour faciliter leur dénombrement sur boîte de Petri, compte tenu de la présence d'une flore annexe très abondante dans les fèces de bovins.

Les cinétiques de croissance ont ensuite été ajustées par différents modèles et les ajustements obtenus ont été comparés (test des modèles emboîtés (test F, cf. Publication N°2)) afin de choisir le modèle décrivant le mieux les données observées. Le choix du modèle de Buchanan à 3 phases linéaires (cf. Equation (3), Chapitre 2 du Mémoire Bibliographique) a été motivé par sa simplicité et sa capacité à décrire les données.

Dans un premier temps, les cinétiques de croissance de la flore totale et de *E. coli* O157:H7 (ou des STEC non-O157:H7) ont donc été ajustées séparément par les 2 modèles suivants :

-Le modèle 1 avec trois paramètres ($y_0, \mu_{\max}, t_{\max}$) est un modèle simple en 2 phases, décrivant les phases exponentielle et stationnaire et ne prenant pas en compte d'éventuelle phase de latence.

-Le modèle 2 avec quatre paramètres ($y_0, \lambda, \mu_{\max}, t_{\max}$), tient compte de cette phase de latence (lag).

↳ avec y_0 , le niveau initial (\log_{10} UFC.mL⁻¹); λ , le temps de latence (h); μ_{\max} , le taux spécifique maximum de croissance (h^{-1}) et t_{\max} (h), le temps auquel débute la phase stationnaire (paramètres du modèle de Buchanan).

Puis, dans un 2^{ème} temps, les cinétiques de croissance des 2 flores ont été ajustées globalement. Deux modèles ont ainsi été utilisés : le modèle 3 (modèle global avec un t_{\max} propre à chaque flore) qui est équivalent aux ajustements individuels des deux flores par le modèle 2 ou le modèle 1 et 2, et le modèle 4 (modèle global avec un t_{\max} commun aux 2 flores), basé sur l'hypothèse d'un arrêt de la croissance des STEC lorsque la flore totale atteint une densité maximale (Effet Jameson, cf. Chapitre 2 du Mémoire Bibliographique).

3. Résultats et discussion

3.1 Pour l'étude N°1 : Matrice « steak haché »

Le modèle 2 a été utilisé pour ajuster séparément les cinétiques de croissance de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe caractérisées chacune par trois phases (une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis stationnaire). Il a, de plus, été montré que, pour chacun des 8 protocoles étudiés, les valeurs estimées de $t_{\max O157}$ et $t_{\max BM}$ étaient non significativement différentes. Les cinétiques de croissance de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe ont alors ensuite été globalement ajustées à l'aide du modèle 4 (modèle global partiel) incluant un t_{\max} commun pour les deux flores (Figure 1, cf. Publication N°2). Ce modèle global de croissance par compétition indique ainsi que la croissance de *E. coli* O157:H7 est stoppée dès que la flore totale (BM) (flore annexe + flore O157) atteint sa densité maximale ($y_{\max BM}$). Il convient de préciser que la flore annexe est supposée majoritaire. En outre, la valeur de $y_{\max BM}$ est relativement constante (8,6 à 8,9 \log_{10} UFC.ml⁻¹) quelque soit le protocole testé.

Cette étude montre également que les différents facteurs d'enrichissement ont peu d'effet sur la croissance simultanée de O157 et de la flore totale. En effet, les différents facteurs sélectifs (i.e. les sels biliaires présents dans le milieu EC et la novobiocine) et la température d'incubation la plus élevée (40°C) n'inhibent en aucun cas la croissance de la flore annexe. De même, cette température d'incubation plus élevée n'augmente que très légèrement le taux de croissance de *E. coli* O157:H7.

Enfin, les prédictions réalisées à l'aide du modèle 4 ont mis en évidence que, pour de faibles niveaux de contamination du steak haché par *E. coli* O157:H7, une période d'incubation trop courte (e.g. 6 heures d'enrichissement pour l'IMS [ISO EN 16654]) ne permettait pas de détecter le pathogène et pouvait, par conséquent, conduire à l'obtention de « faux négatifs ». Ainsi, compte tenu, d'une part, du niveau moyen en flore annexe présent dans le steak haché et, d'autre part, du faible niveau de contamination des échantillons par *E. coli* O157:H7, une période d'incubation de 10 à 12h a été définie comme optimale pour l'enrichissement d'échantillons de steak haché contaminés.

3.2 Pour l'étude N°2 : Matrice « fèces de bovins »

Les cinétiques de croissance des souches de STEC non-O157:H7 obtenues dans cette étude sont uniquement caractérisées par deux phases (une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire) et ont ainsi été ajustées à l'aide du modèle 1 (cf. Publication N°3). Il s'avère toutefois important de souligner que la croissance d'une des deux souches de STEC (Strain 2) a été inhibée par la présence de novobiocine dans le milieu d'enrichissement. Les cinétiques de croissance de la flore totale ont, en revanche, été ajustées à l'aide du modèle 2, incluant une phase de latence (Fig.1. Publication N°3). Comme observées dans l'étude N°1, les valeurs de $t_{\max STEC}$ et $t_{\max BM}$ sont relativement proches et un modèle global de croissance par compétition (model 4, cf. Publication N°3) a été utilisé pour ajuster globalement les données de croissance des 2 flores (Fig.1. Publication N°3). L'hypothèse d'un effet Jameson a ainsi été mise en avant pour expliquer l'arrêt de la croissance des STEC lors de l'enrichissement d'échantillons de fèces de bovins contaminés. Les valeurs de $y_{\max BM}$ sont également stables (8,1 à 8,4 \log_{10} UFC.ml⁻¹) quelque soit le protocole testé.

Cette étude montre, d'autre part, que certains facteurs d'enrichissement ont un effet sur la croissance simultanée de la flore totale et des souches de STEC non-O157:H7. Plus précisément, les protocoles d'enrichissement avec de la novobiocine et des sels biliaires permettent une augmentation des valeurs de t_{\max} induisant, par conséquent, des valeurs plus élevées de la densité maximale atteinte par STEC ($y_{\max STEC}$) après 24h d'enrichissement (Fig.1. Publication N°3). En effet, la novobiocine et les sels biliaires retardent l'apparition de l'effet Jameson en allongeant le temps de latence de la flore totale (λ_{BM}) et permettent, ainsi, une croissance plus longue des STEC dans le milieu d'enrichissement. Néanmoins, cette étude

révèle également que la novobiocine, dont l'action est initialement dirigée contre la flore annexe, peut désavantager la croissance des STEC (la croissance de la souche N°2 étant inhibée en présence de novobiocine dans le milieu) et conduire ensuite à l'obtention de faux négatifs. De même, considérant conjointement les faibles niveaux en STEC et la densité élevée en flore annexe dans les échantillons de fèces, les prédictions réalisées à l'aide du modèle 4 mettent en évidence l'apparition (potentielle) plus fréquente de résultats « faux négatifs » après un enrichissement en milieu TSB par rapport à un enrichissement en milieu EC.

Ainsi, l'utilisation du milieu EC sans novobiocine semble plus approprié pour la recherche des STEC dans les fèces de bovins, évitant l'obtention de faux négatifs et ainsi la sous-estimation de la prévalence des STEC dans les élevages bovins.

3.3 Pour l'étude N°3 : Matrice « lait cru »

Etant donné la non publication des résultats concernant cette étude N°3, une présentation plus détaillée de ces derniers sera effectuée dans les lignes qui suivent.

3.3.1 Ajustement individuel des cinétiques de croissance de O157 et FT

Les cinétiques de croissance des deux souches O157 (Souche 2 et Souche 4) semblent d'une manière générale être caractérisées par trois phases : i.e. une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis stationnaire (Figure 12). Le modèle 2 a donc été utilisé pour ajuster globalement les données de croissance obtenues pour ces deux souches. Le choix d'une phase de latence non nulle est justifié par le fait que ce modèle 2 ajuste significativement mieux les données de croissance que le modèle 1 ($P_{test F} < 0.05$), pour les 8 protocoles testés.

En revanche, les cinétiques de croissance de la flore totale sont uniquement caractérisées par deux phases : une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire (Figure 12). Le modèle 1 a alors été utilisé pour ajuster les données de croissance de la flore totale pour chacun des 8 protocoles d'enrichissement puisqu'aucune différence significative ($P_{test F} > 0.05$) (en terme de somme résiduelle des carrés des écarts) n'a été mise en évidence entre le modèle 1 (2 phases) et le modèle 2 (3 phases), excepté pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C ($0.003 < P_{test F} < 0.02$).

3.3.2 Ajustement global des cinétiques de croissance de O157 et FT

A l'inverse des résultats obtenus pour les matrices « steak haché » et « fèces de bovins », les valeurs des t_{\max} de la flore totale ($t_{\max FT}$) et de la flore O157 ($t_{\max O157}$) ne sont pas similaires (excepté pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C) (Figure 12). En effet, pour les six autres protocoles, les valeurs de $t_{\max FT}$ sont supérieures à celles de $t_{\max O157}$, ce qui traduit un arrêt de la croissance des deux souches de *E. coli* O157:H7, avant celle de la flore totale (Tableau XIV). Aussi, dans le cas de la matrice lait cru, le seul effet Jameson (cf. Chp2 Mémoire Bibliographique) ne peut suffire à expliquer l'arrêt de la croissance des deux souches O157 et d'autres types d'interaction entre les deux flores pourraient alors intervenir. Les données de croissance de la flore totale et de la flore O157 n'ont donc pas pu être ajustées globalement à l'aide du modèle 4 (modèle partiel avec un t_{\max} commun pour les deux flores). En effet, le modèle 3 (modèle complet avec un t_{\max} propre à chaque flore) ajustait significativement mieux les données ($P_{test F} < 0.01$) que le modèle partiel (4), excepté pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C ($0.25 < P_{test F} < 0.5$). En outre, il est important de souligner que le niveau maximum atteint par la flore totale ($y_{\max FT}$) est quasi constant d'un protocole à un autre (8,7 à 9,2 log₁₀ UFC.ml⁻¹).

Protocoles	$t_{\max O157}$ (h)	$t_{\max FT}$ (h)	$t_{\max O157} - t_{\max FT}$ (h)
TSB.N-.40°C	8,6	8,1	+ 0,5
TSB.N-.37°C	9	9,4	-0,4
TSB.N+.40°C	10,8	12,1	-1,3
TSB.N+.37°C	10,6	13,4	-2,8
EC.N-.40°C	10,5	11,9	-1,4
EC.N-.37°C	11,2	14,2	-3
EC.N+.40°C	11,3	14	-2,7
EC.N+.37°C	11,2	14,6	-3,4

Tableau XIV : Valeurs (heures) de $t_{\max FT}$ et $t_{\max O157}$, et de la différence entre $t_{\max O157}$ et $t_{\max FT}$

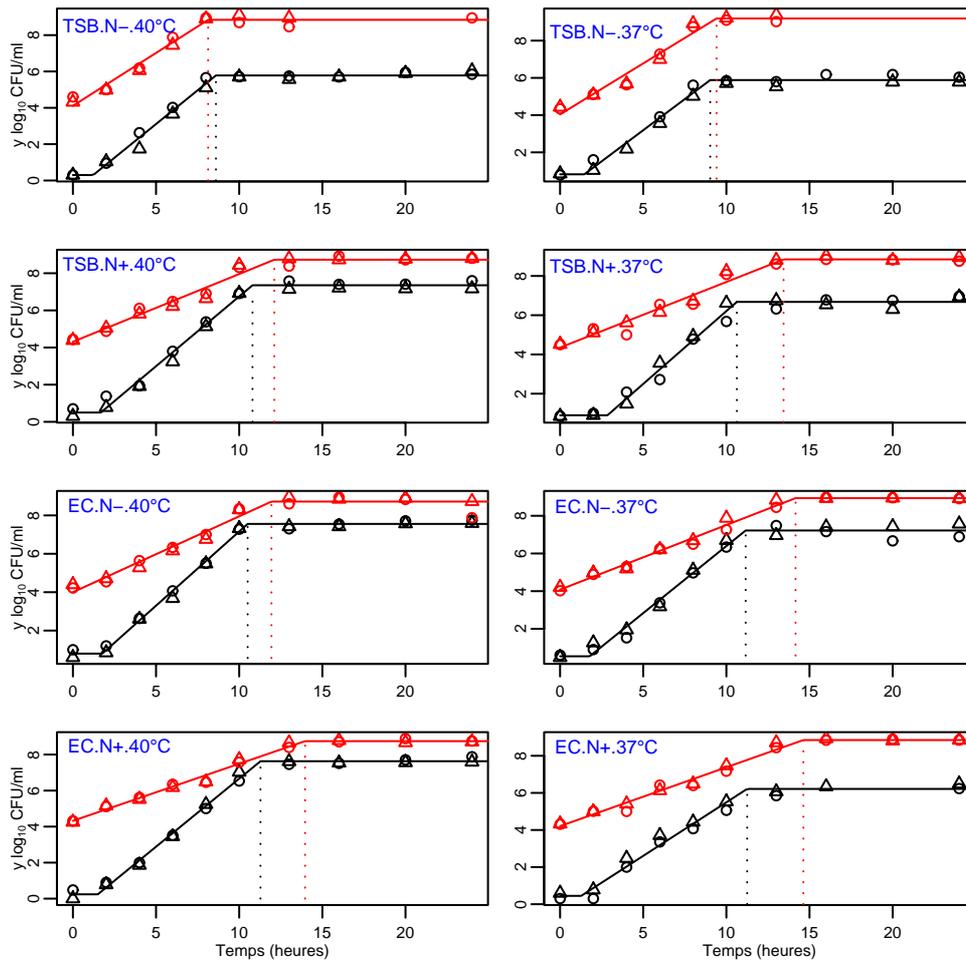


Figure 12 : Cinétiques de croissance des 2 souches de *E. coli* O157:H7 (couleur noire) et de la flore totale (couleur rouge) et courbes théoriques obtenues après ajustement à l'aide du modèle 3, pour les 8 protocoles testés. Δ , Souche 2; \circ , Souche 4.

3.3.3 Impacts des facteurs d'enrichissement sur les paramètres de croissance de O157 et FT

Comme indiqué sur la Figure 13a et 13b, le niveau initial de O157 (y_{0O157}) et de FT (y_{0FT}) n'est pas influencé par le type de protocole testé. Les facteurs d'enrichissement ont également peu d'effet sur le temps de latence de O157 (λ_{O157}), même si les valeurs de λ_{O157} sont toutefois plus élevées pour le protocole TSB.N+ à 37°C (Figure 13c). De même, la Figure 13d montre que les protocoles d'enrichissement ont peu d'impact sur le taux maximum de croissance de O157 ($\mu_{\max O157}$), excepté pour le protocole EC.N+.37°C pour lequel les

valeurs de $\mu_{\max O157}$ sont plus faibles. En revanche, un effet des protocoles d'enrichissement est visible sur le taux maximum de croissance de la flore totale ($\mu_{\max FT}$), avec des valeurs de $\mu_{\max FT}$ plus élevées pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C (respectivement 1,3 et 1,4 h⁻¹), par rapport aux six autres protocoles testés (Figure 13e). Ainsi, étant donné les valeurs de $\mu_{\max FT}$ plus élevées pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C, le niveau maximum en FT ($y_{\max FT}$) est atteint plus rapidement, expliquant alors des valeurs de $t_{\max FT}$ plus faibles pour ces deux protocoles (respectivement 9,4 et 8,2 h⁻¹) que pour les autres protocoles testés (Figure 13f).

La novobiocine et les sels biliaries (présents dans le milieu EC) auraient donc un effet sur le taux maximum de croissance de la flore totale (valeurs de $\mu_{\max FT}$ plus faibles en présence de ces deux facteurs sélectifs) induisant ainsi des valeurs de $t_{\max FT}$ plus élevées. A noter que l'effet des sels biliaries sur la flore totale serait légèrement supérieur à celui de la novobiocine (Figure 13e et 13f).

En conséquence, les valeurs de $t_{\max O157}$ sont moins élevées pour les protocoles TSB.N- à 37 et 40°C (Figure 13g). En effet, pour ces deux protocoles, le niveau en flore totale est atteint plus rapidement (valeurs de $t_{\max FT}$ plus faibles) induisant alors un arrêt également plus rapide de la croissance des deux souches O157 et, ainsi, des valeurs de $y_{\max O157}$ plus faibles que celles observées pour les autres protocoles (Tableau XV). Il convient de noter que le faible taux de croissance de O157 observé pour le protocole EC.N+.37°C tend à expliquer les plus faibles valeurs de $y_{\max O157}$ pour ce protocole. De même, les valeurs de $y_{\max O157}$ également plus faibles pour le protocole TSB.N+.37°C peuvent être expliquées par un temps de latence de O157 plus long pour ce protocole d'enrichissement.

L'arrêt de la croissance de O157 semble, dans le cas des protocoles TSB.N- à 37 et 40°C ($t_{\max O157}$ et $t_{\max FT}$ proches), être lié à un épuisement d'un substrat commun aux 2 flores (effet Jameson). En revanche, pour les autres protocoles, la croissance de O157 est stoppée quelques heures avant que la flore totale n'atteigne son propre $y_{\max FT}$, infirmant ainsi l'hypothèse d'un « simple » effet Jameson et laissant entrevoir l'hypothèse d'autres types d'interaction entre les 2 flores pour expliquer l'arrêt de la croissance des 2 souches de O157. En effet dans le cas du lait cru, la flore lactique étant la flore annexe majoritaire, une production d'acide lactique ou encore de bactériocines par cette flore pourrait potentiellement expliquer cet arrêt précoce de la flore O157.

Protocoles	Souche 2	Souche 4
TSB.N-.40°C	5,8	5,8
TSB.N-.37°C	5,7	6
TSB.N+.40°C	7,2	7,5
TSB.N+.37°C	6,6	6,7
EC.N-.40°C	7,5	7,6
EC.N-.37°C	7,3	7,1
EC.N+.40°C	7,6	7,6
EC.N+.37°C	6,3	5,9

Tableau XV : Valeurs (\log_{10} UFC.ml⁻¹) de $y_{\max O157}$ obtenues pour les 8 protocoles étudiés et pour chacune des souches de O157 testées.

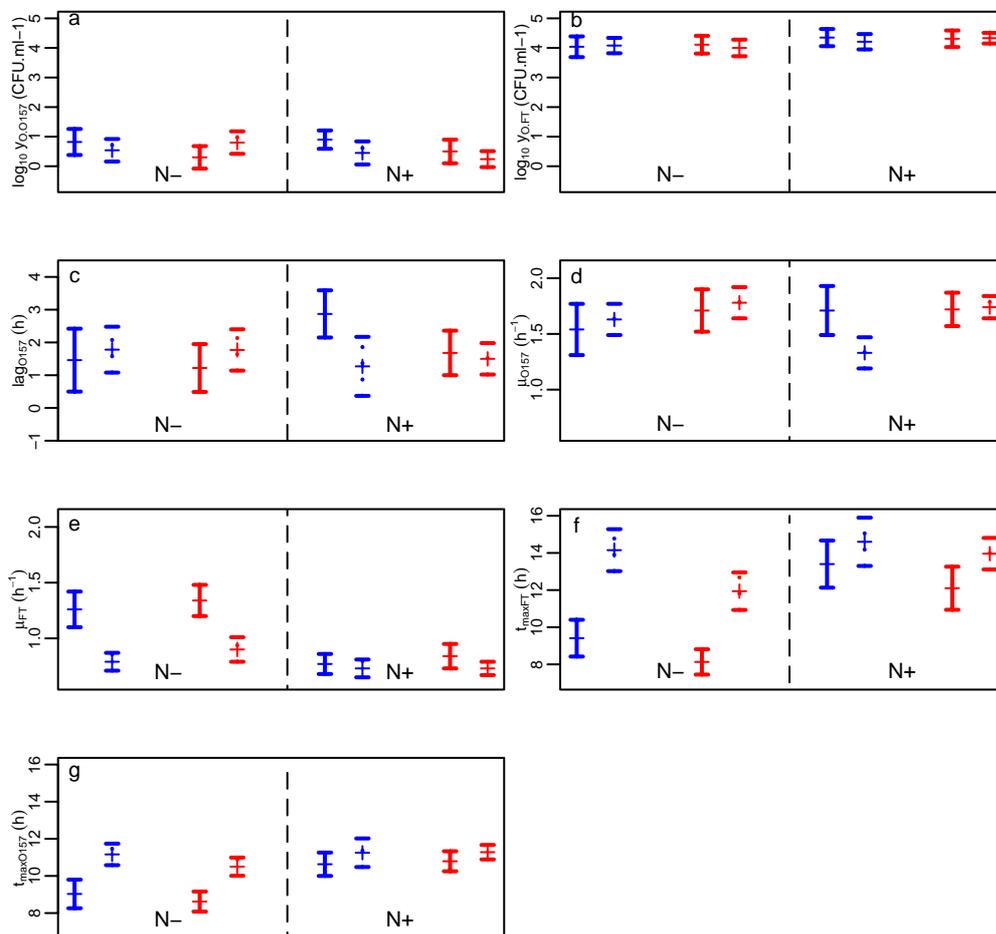


Figure 13 : Graphique représentant les paramètres estimés par le modèle 3 et les intervalles de confiance (95%) associés. (a) y_{0O157} ; (b) y_{0FT} ; (c) λ_{O157} ; (d) $\mu_{\max O157}$; (e) $\mu_{\max FT}$; (f) $t_{\max FT}$; (g), $t_{\max O157}$. Les données obtenues à 37 et 40°C apparaissent respectivement en bleu et en rouge. Les résultats obtenus pour les milieux TSB et EC sont respectivement indiqués en traits pleins et pointillés. N+, protocoles avec novobiocine ; N-, protocoles sans novobiocine.

3.3.4 Etude complémentaire : suivi de pH durant la phase d'enrichissement

Compte tenu de la mise en évidence entre les deux flores étudiées d'une interaction plus complexe que la compétition simple (effet Jameson), une étude complémentaire a été réalisée. En effet, l'hypothèse probable de l'existence d'autres types d'interaction entre la flore annexe et la flore O157, notamment la production d'acide par la flore lactique, nous a conduit à effectuer simultanément un suivi de la croissance de la flore annexe et du pH lors de l'enrichissement d'échantillons de lait cru dans du TSB.N- et du TSB.N+ à 37°C.

Une diminution du pH de 7,1 à 4,2 dans le milieu TSB.N-.37°C, et de 7,1 à 5,2 dans le milieu TSB.N+.37°C (résultats non exposés) a été mise en évidence. La production d'acide (probablement lactique) est donc effective lors de l'enrichissement d'un échantillon de lait cru et cette production semble plus faible en présence de novobiocine dans le milieu d'enrichissement. Cet antibiotique de la famille des aminocoumarins (toxicité contre les bactéries à Gram+) aurait donc une action contre une partie des bactéries lactiques, ce qui pourrait expliquer la diminution moins marquée du pH observée dans le milieu TSB.N+.37°C. Un arrêt de la croissance de O157 serait alors potentiellement plus rapide dans un milieu non sélectif lors de l'enrichissement d'échantillons de lait cru contaminés. Il est d'ailleurs intéressant de rappeler que, lors des suivis simultanés de croissance évoqués précédemment, la croissance de O157 était interrompue plus rapidement dans les milieux TSB ne contenant aucun agent sélectif (Figure 12, Tableau XV).

Nauta et Dufrenne (1999) reportent en moyenne des valeurs de pH_{opt} d'environ 6,9, et de pH_{min} de 4,2 (acide chlorhydrique) pour *E. coli* O157:H7. Ainsi, compte tenu de ces valeurs cardinales de pH et de la diminution de pH observée lors de cette étude complémentaire, l'arrêt « précoce » de la croissance des 2 souches de *E. coli* O157:H7 pourrait être expliqué par la production d'acide lactique induisant une baisse du pH dans le milieu d'enrichissement (malgré la présence de tampons).

Il aurait donc été judicieux d'utiliser des modèles récents, faisant intervenir d'autres types d'interactions (e.g. l'accumulation de produits toxiques) (Van Impe et al., 2005 ; Poshtet et al., 2005) mais leur utilisation dans l'ajustement des cinétiques aurait nécessité la mesure du pH ou de la production de composés divers lors des suivis de croissance (Figure 12), ce qui n'avait pas été prévu dans les expérimentations réalisées.

3.3.5 Conclusion

Dans le cas de la matrice « lait cru », le seul effet Jameson ne suffit pas à expliquer l'arrêt de la croissance des deux souches O157 et d'autres types d'interaction entre les deux flores pourraient alors intervenir. L'hypothèse d'une production d'acide par la flore lactique, stoppant la croissance de *E. coli* O157:H7 est envisageable compte tenu de la diminution de pH observée lors de l'enrichissement complémentaire d'un échantillon de lait cru. L'hypothèse d'une production de bactériocine(s) est par ailleurs également plausible.

4. Comparaison des résultats obtenus pour les 3 études

Ce paragraphe fait l'objet d'une comparaison des similitudes et différences entre les résultats obtenus à l'issue de ces trois études. Le 1^{er} élément concerne l'ajustement individuel des cinétiques de chaque flore (STEC O157/non-O157 et la flore totale). En effet, pour la matrice « steak haché », le modèle 2 a été utilisé pour ajuster les cinétiques des deux flores décrivant alors une phase de latence pour chacune des flores. Concernant l'étude N°2, les données de croissance de la flore totale ont été ajustées à l'aide du modèle 2 alors que le choix d'une phase de latence nulle (modèle 1) a été retenu pour ajuster celles des 2 souches de STEC non-O157. Par ailleurs, une situation inverse est observée dans l'étude N°3, avec l'ajustement des données de la croissance des 2 souches de *E. coli* O157:H7 et de la flore annexe du lait cru respectivement à l'aide du modèle 2 et du modèle 1. Ainsi, ces ajustements pourraient laisser entrevoir un début de croissance plus rapide des STEC non-O157:H7 (Etude N°2, absence de phase de latence) par rapport aux souches de *E. coli* O157:H7, pour lesquelles un temps de latence est systématiquement observé quelle que soit la matrice considérée (steak haché ou lait cru). Ces conclusions peuvent paraître quelque peu hâtives, étant donné le faible nombre de souches étudiées et de répétitions effectuées et mériteraient ainsi d'être confirmées en utilisant un plus grand nombre de souches et sérotypes. En effet, il est important de rappeler que la croissance d'une souche de STEC non-O157:H7 est inhibée en présence de novobiocine, bien que l'action de cet antibiotique soit initialement dirigée contre les bactéries à Gram +. D'autre part, quelque soit le protocole d'enrichissement testé, un début de croissance plus rapide de la flore annexe du lait cru est observé par rapport à celui de la flore annexe du steak haché et des fèces de bovins. En effet, un temps de latence est observé pour ces deux types de flores et celui-ci est d'autant plus long avec des protocoles d'enrichissement incluant des agents sélectifs.

Par ailleurs, pour les études N°1 et 2 (contrairement à l'étude N°3), un modèle global de croissance par compétition a été utilisé pour ajuster globalement les données de croissance des 2 flores, confirmant ainsi l'hypothèse d'un effet Jameson pour expliquer l'arrêt de la croissance des STEC (O157 ou non-O157). Dans le cas de la matrice « lait cru », il s'avère que le seul effet Jameson ne suffit pas à expliquer l'arrêt de la croissance de O157 et d'autres types d'interaction entre les deux flores pourraient alors intervenir (e.g. la production d'acide par la flore lactique). Le modèle 4 utilisé dans les deux premières études se révèle donc inadapté dans cette 3^{ème} étude et l'utilisation du modèle de Van Impe et al. (2005) faisant intervenir les effets de substances produites toxiques pour la croissance du pathogène cible aurait été plus appropriée si les données nécessaires à son ajustement avaient été recueillies.

Enfin, des différences apparaissent également au niveau de l'impact des facteurs d'enrichissement sur la croissance des STEC et de la flore annexe de chaque matrice étudiée. Peu d'effets des facteurs d'enrichissement sur la croissance des souches O157 et de la flore annexe du steak haché sont à dénombrer. A l'inverse, comme souligné précédemment, la novobiocine inhibe la croissance d'une souche de STEC non-O157 mais, tout comme les sels biliaires, prolonge également le temps de latence de la flore totale, ce qui se traduit par une croissance prolongée des STEC dans ce type de protocole par rapport aux protocoles d'enrichissement non sélectifs. Un effet des facteurs sélectifs sur le taux de croissance de la flore totale est également observé dans l'étude N°3.

Ainsi, alors qu'aucune différence de performance n'a été observée entre les différents protocoles d'enrichissement testés pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché, l'utilisation du milieu EC sans novobiocine se révèle plus adaptée pour la recherche des STEC dans les fèces de bovins, évitant l'obtention potentielle de faux négatifs.

Comme évoqué ici, les facteurs sélectifs destinés à ralentir ou inhiber la croissance de la flore annexe afin de permettre une meilleure croissance de la bactérie cible peuvent également avoir une action négative sur la croissance de cette bactérie cible. L'exemple de la novobiocine (Etude N°2) illustre parfaitement ce phénomène potentiel. Ainsi, nous avons pensé qu'il était intéressant et judicieux, dans le contexte de l'optimisation de l'étape d'enrichissement, d'étudier plus précisément ce phénomène. Le chapitre suivant relate les résultats de l'étude menée pour investiguer l'action de la novobiocine sur différents sérotypes de STEC.



PUBLICATION N°2



Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols

A. Vimont,^{1*} C. Vernozzy-Rozand,¹ M. P. Montet,¹ C. Lazizzera,² C. Bavai,¹
and M.-L. Delignette-Muller¹

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France,¹ and Unité de Bactériologie Bovine et Sécurité des Viandes, Afssa de Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France²

Received 13 May 2005/Accepted 25 September 2005

The simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 (O157) and the ground beef background microflora (BM) was described in order to characterize the effects of enrichment factors on the growth of these organisms. The different enrichment factors studied were basal medium (Trypticase soy broth and *E. coli* broth), the presence of novobiocin in the broth, and the incubation temperature (37°C or 40°C). BM and O157 kinetics were simultaneously fitted by using a competitive growth model. The simple competition between the two microfloras implied that O157 growth stopped as soon as the maximal bacterial density in the BM was reached. The present study shows that the enrichment protocol factors had little impact on the simultaneous growth of BM and O157. The selective factors (i.e., bile salts and novobiocin) and the higher incubation temperature (40°C) did not inhibit BM growth, and incubation at 40°C only slightly improved O157 growth. The results also emphasize that when the level of O157 contamination in ground beef is low, the 6-h enrichment step recommended in the immunomagnetic separation protocol (ISO EN 16654) is not sufficient to detect O157 by screening methods. In this case, prior enrichment for approximately 10 h appears to be the optimal duration for enrichment. However, more experiments must be carried out with ground beef packaged in different ways in order to confirm the results obtained in the present study for non-vacuum- and non-modified-atmosphere-packed ground beef.

Escherichia coli O157:H7 and other virulent Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes, such as O26, O55, O91, O103, O111, O128, and O145, are an emerging cause of food-borne illness and have become a public health priority (13). In human infections, O157 and the other serotypes mentioned above may cause bloody diarrhea and, more precisely, may lead to hemolytic-uremic syndrome and to thrombotic and thrombocytopenic purpura in children and adults, respectively (33, 57). Illness is often linked to the consumption of contaminated or undercooked ground beef (6, 14, 15, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 54). For instance, in Scotland 512 persons were infected by *E. coli* O157:H7 after consumption of beef, and 34 cases of hemolytic-uremic syndrome and 17 deaths were reported (18). Moreover, in samples of food responsible for diseases, the levels of contamination with *E. coli* O157:H7 are sometimes very low. For instance, a level of 4 CFU in 25 g of food caused a food-borne disease in a Japanese school in 1996 (53). Thus, very sensitive detection methods are required.

Different methods of screening for *E. coli* O157:H7 are now available, including genetic methods like PCR (9, 36, 38) and immunological methods like immunomagnetic separation (IMS) and enzyme-linked immunosorbent assays (7, 16, 37). These methods require an enrichment step to improve their limits of detection (8, 25, 39, 58). Cui et al. (20) reported that

the PCR detection limit decreases from 3 log₁₀ CFU g⁻¹ with no prior enrichment to 0 log₁₀ CFU g⁻¹ with a 6-h enrichment step at 37°C. For IMS combined with a detection method (IMS-DM), the detection limit decreases from 4 log₁₀ CFU g⁻¹ with no prior enrichment to 1 log₁₀ CFU g⁻¹ with a 6-h enrichment step at 37°C (28).

Several enrichment protocols are currently used for growth of *E. coli* O157:H7, and they are characterized by different factors. The main enrichment protocol factors are the enrichment broth (basal medium), the addition of antibiotics, the temperature, and the length of the enrichment period. In previous studies, Trypticase soy broth (TSB) and *E. coli* broth (EC) have frequently been used as basal media, often with one antibiotic added (novobiocin in most studies) (1, 20, 22, 24, 41, 58). For incubation, the enrichment broth is most often incubated at 37°C for 16 to 24 h (1, 22). Nevertheless, some authors have reported an optimal growth temperature for *E. coli* O157:H7 of around 40°C (31, 44), and in recent studies workers have also used this temperature for incubation of enrichment cultures (1, 2, 32). However, there have been few studies in which the workers tried to compare the efficacies of different enrichment protocols, and the few results obtained have been different in different studies (21, 39, 42, 58).

Furthermore, the enrichment step may be difficult to control because of the presence of background microflora (BM), which may influence the growth of *E. coli* O157:H7. Some authors have described antagonistic activity of background microflora against *E. coli* O157:H7 (23, 52, 55, 60). It must be emphasized that in order to optimize the enrichment conditions, it is es-

* Corresponding author. Mailing address: Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France. Phone: 33-4-78-87-25-50. Fax: 33-4-78-87-25-54. E-mail: a.vimont@vet-lyon.fr.

TABLE 1. *E. coli* O157:H7 strains used in this study

Strain	Origin ^a
1	Food (ground beef)
2	Clinical (HUS)
3	Environmental (feces)
4	Food (milk)

^a Strains were obtained from the National Reference Laboratory of STEC, Marcy-l'Etoile, France. HUS, hemolytic-uremic syndrome.

essential to understand the interaction between the two floras during simultaneous growth. However, so far there has been little information concerning this.

The aim of the present study was to investigate the effects of different enrichment factors on simultaneous growth of the background microflora and *E. coli* O157:H7 in ground beef. The different factors studied were the basal medium (TSB and EC), the presence of novobiocin in broth (N+ or N-), and the incubation temperature (37°C and 40°C). In order to visualize the potential effects of factors and thus to optimize the enrichment step, growth follow-up and modeling of the simultaneous growth of the background microflora and *E. coli* O157:H7 were carried out.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum preparation. All four strains used in the present study were stored at -80°C in a glycerol-containing medium. Table 1 shows the sources of these strains. Prior to challenge testing each strain was grown in brain heart infusion (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) at 37°C in order to obtain late-exponential-phase cultures. After 24 h, all the cultures had reached a density of 10⁸ CFU ml⁻¹, and these precultures were used for inoculation of ground beef samples.

Microbiological culture media. In different stages of the study, various microbiological culture media were used. Tryptone medium (Fluka-Biochemika, Switzerland) was used for preparation of serial dilutions throughout the experiments. TSB (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) and EC (Fluka-Biochemika, Switzerland) were tested with novobiocin (TSB.N+ and EC.N+) (at a concentration of 20 mg liter⁻¹; Sigma, Steinheim, Germany) or without novobiocin (TSB.N- and EC.N-) in the enrichment protocol study. Finally, plate count agar (PCA) (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) and sorbitol MacConkey agar (Biokar, Beauvais, France) supplemented with a cefixime-tellurite mixture (CT-SMAC) (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) were used as a nonselective medium for enumeration of the ground beef background microflora and as a selective medium for enumeration and isolation of *E. coli* O157:H7 (O157) during the enrichment step, respectively.

Ground beef sample inoculation. Four packages containing two 125-g portions of ground beef (15% fat, non-vacuum- and non-modified-atmosphere-packed packages) were purchased, two from each of two supermarkets in the suburbs of Lyon (France). All eight 125-g portions of ground beef were mixed together, and 25-g portions of meat were aseptically weighed into 32 flasks and stored at 4°C for less than 24 h before the experiments. The precultures of the four *E. coli* O157:H7 strains were serially diluted in order to obtain a final concentration of 3 log₁₀ CFU ml⁻¹ in fresh tryptone medium, and then each portion was individually inoculated (1 ml) into a series of eight different flasks containing the 25-g portions of ground beef. After manual homogenization, the 32 flasks (8 flasks for each strain) were stored overnight at 4°C. Next, the contents of each of the 32 flasks were transferred into a stomacher bag to which 225 ml of TSB.N-, TSB.N+, EC.N-, or EC.N+ was added according to the growth enrichment protocol (Table 2). Hence, the final concentration was roughly 4 CFU of O157 per ml in each stomacher bag.

Enrichment protocols. Growth experiments were carried out with the four O157 strains in the presence of BM for different enrichment protocols, which were the result of the combination of two temperatures (37 or 40°C), two basal media (TSB and EC), and the presence or absence of novobiocin (N+ and N-) (Table 2). To do this, the 32 samples obtained at the end of the ground beef sample inoculation were stomached for 1 min and left at the ambient temperature for a regeneration step for 40 min.

TABLE 2. Enrichment protocols tested in the present study

Basal medium	Novobiocin ^a	Temp (°C) ^b	Code
TSB	N-	37	TSB.N - .37
	N+	37	TSB.N + .37
	N-	40	TSB.N - .40
	N+	40	TSB.N + .40
EC	N-	37	EC.N - .37
	N+	37	EC.N + .37
	N-	40	EC.N - .40
	N+	40	EC.N + .40

^a N+, novobiocin added; N-, novobiocin not added.

^b The basal medium and antibiotics were incubated at 37 or 40°C.

Growth monitoring. At each sampling time (every 2 h for each enrichment protocol), the numbers of viable cells of BM and O157 were determined by plating 1-ml portions of appropriate dilutions of samples onto PCA and 0.1-ml portions onto CT-SMAC, respectively. After incubation, the colonies on PCA and CT-SMAC plates were counted in order to obtain BM and O157 growth data for each enrichment protocol.

Growth modeling. (i) **Modeling of individual BM and O157 growth kinetics.** Two growth models were used to separately fit individually observed BM and O157 growth kinetics for the eight protocols tested. The first model, which has three parameters, is a very simple model with two phases (5, 43) (model 1). It describes only the exponential and stationary phases and does not take into account any lag phase:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t & \text{if } t < t_{\max} \\ y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t_{\max} & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (1)$$

where $y(t)$ is the bacterial density (in log₁₀ CFU ml⁻¹) at time t (in h), y_0 is the initial bacterial density (in log₁₀ CFU ml⁻¹), μ_{\max} is the maximum specific growth rate (in h⁻¹), and t_{\max} is the time at which the stationary phase begins (i.e., the time at which the maximum bacterial density is reached).

The second model, which has four parameters, incorporates a third phase, the lag phase (λ) (in h) (model 2). It has been given different names by various authors (11, 43). Curves described by this model have an abrupt transition (breakpoint) between the lag and exponential phases:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 & \text{if } t < \lambda \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t - \lambda) & \text{if } \lambda \leq t < t_{\max} \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t_{\max} - \lambda) & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (2)$$

(ii) **Global modeling of simultaneous growth of BM and O157.** A global model for the simultaneous growth of BM and O157 is defined simply by using model 2 for each flora (model 3). It is defined by eight parameters (y_{0O157} , λ_{O157} , $\mu_{\max O157}$, $t_{\max O157}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, and $t_{\max BM}$), which may be equivalently estimated by two individual fittings of model 2 with BM and O157 growth kinetics or by global fitting of model 3. A partial model nested in model 3 is also defined in the same way, but a common value for t_{\max} is assumed for the two floras (model 4). The last model thus has only seven parameters (y_{0O157} , λ_{O157} , $\mu_{\max O157}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, and t_{\max}) and is based on the hypothesis that there is competition between the two floras studied. More precisely, in model 4 the growth of each microflora is assumed to stop as soon as one microflora reaches its maximum density in the enrichment basal medium. This phenomenon has been described previously and is commonly called the Jameson effect (10, 12, 17, 30, 40, 48).

Statistical methods. Fitting of models to the BM and O157 data was performed by nonlinear regression (4) by using the least-squares criterion. Estimates for parameters were obtained by minimizing the residual sum of squares (RSS):

$$RSS = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3)$$

where N is the number of data points, y_i is the observed data value, and \hat{y}_i is the fitted value. Nonlinear regression was computed with the NonlinearLeastSquares

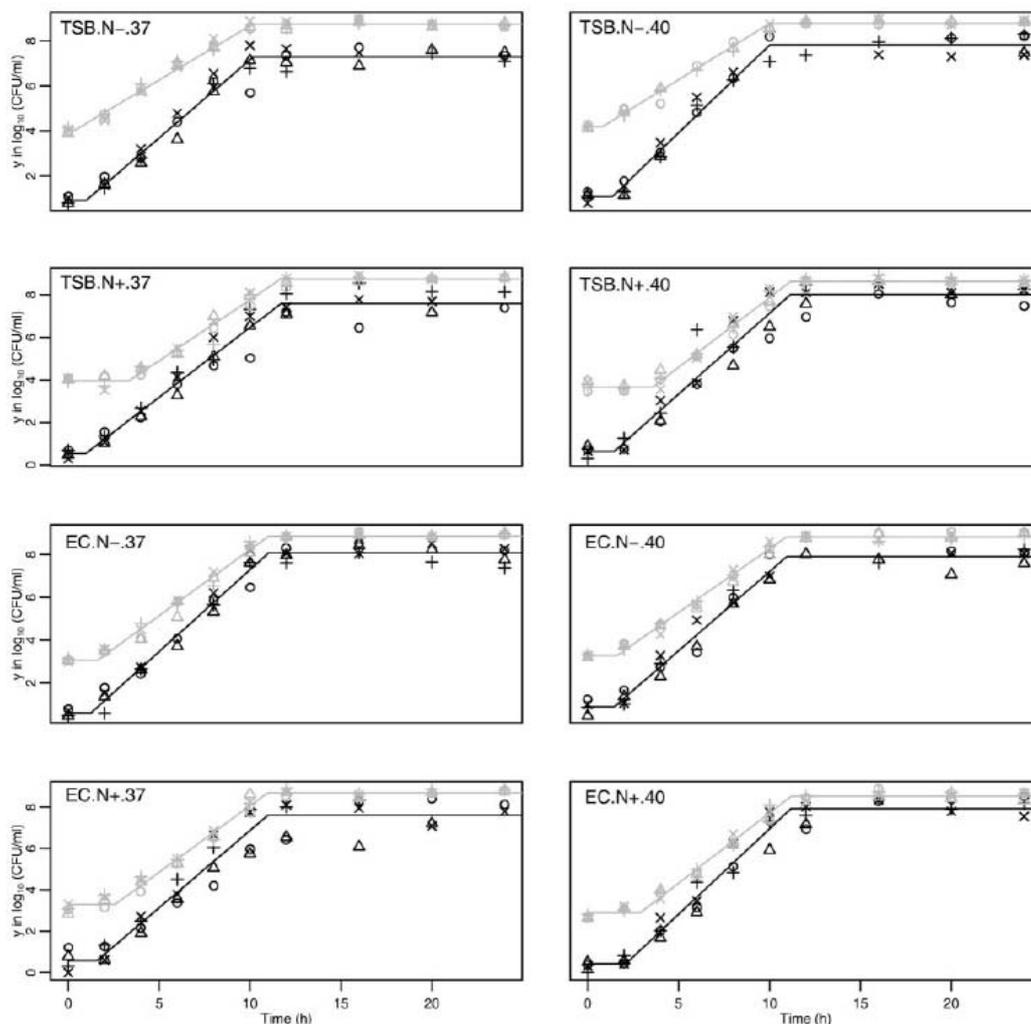


FIG. 1. Simultaneous growth kinetics of the four *E. coli* O157:H7 strains and background microflora obtained for the eight protocols and theoretical curves obtained by fitting of model 4. ○, strain 1; △, strain 2; +, strain 3; ×, strain 4. Gray symbols and curves show the data for the background flora, and black symbols and curves show the data for O157.

function of R-Software (35). The precision of each parameter estimate was also reported in terms of asymptotic marginal confidence intervals. Comparisons of nested models (model 2 nested in model 1 and model 4 nested in model 3) were performed using an *F* test (4):

$$F_{obs} = \frac{(N - p_f)(RSS_p - RSS_f)}{(p_f - p_p)(RSS_f)} \quad (4)$$

where *N* is the size of the data set, *p_f* is the number of parameters of the full model, *p_p* is the number of parameters of the partial model, *RSS_f* is the residual sum of squares of the full model fit, and *RSS_p* is the residual sum of squares of the partial model fit. The observed *F* value (*F_{obs}*) must be compared with a theoretical *F* value with *v₁* = *p_f* - *p_p*, *v₂* = *N* - *p_f*, and degrees of freedom.

An analysis of variance was carried out in order to compare the maximum levels of O157 reached at the end of the different enrichment protocols. To do this, the maximum level (*y_{max}*) was calculated for each of the four strains tested and each protocol by determining the average of the bacterial counts measured

after 12 h. A mixed analysis of variance model was considered, in which the basal medium, the addition of antibiotic (novobiocin), and the temperature were fixed factors and the strain was a random factor. The level of significance for each factor and each interaction was *P* < 0.05.

RESULTS

Individual fits of BM and O157 growth kinetics. For each enrichment protocol studied, almost the same growth kinetics were obtained for all strains, which were characterized by three phases, a short lag phase followed by an exponential phase and a stationary phase (Fig. 1). For each enrichment protocol, model 2 was thus globally fitted to data obtained for the four strains. The use of a nonnull lag phase was justified by the fact

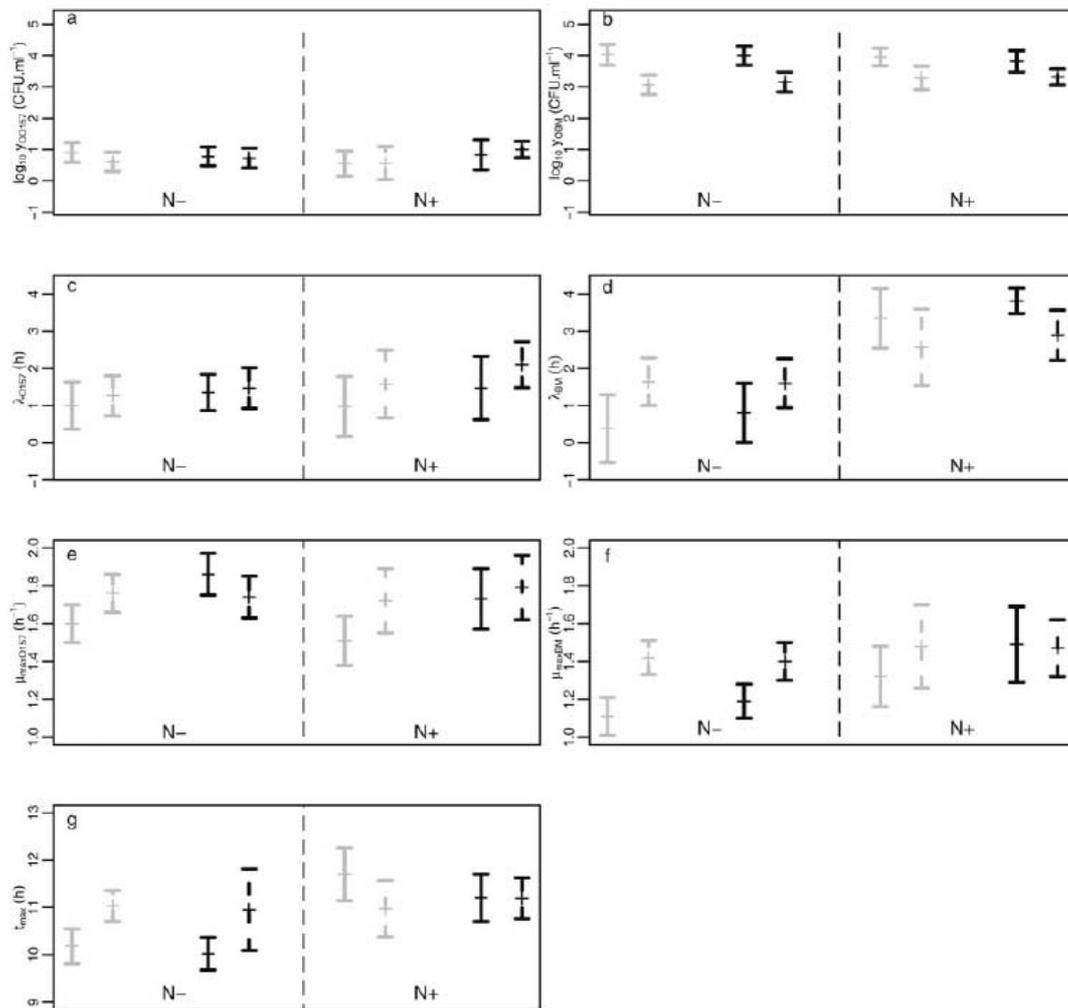


FIG. 2. Plots of the estimated growth parameters for model 4 and the corresponding 95% asymptotic confidence intervals. (a) y_{0O157} ; (b) y_{0BM} ; (c) λ_{O157} ; (d) λ_{BM} ; (e) $\mu_{maxO157}$; (f) μ_{maxBM} ; (g) t_{max} . Gray indicates data obtained at 37°C, and black indicates data obtained at 40°C. The results obtained for EC and TSB are indicated by dotted and solid lines, respectively. N+ and N- indicate protocols with and without novobiocin, respectively.

that model 2 fits the growth data significantly better than model 1 ($P < 0.05$, as determined by an F test) in all the cases except one protocol ($P = 0.12$ for protocol TSB.N+.37, as determined by an F test).

Global fits of simultaneous growth of BM and O157. Figure 1 shows that for each of the eight protocols studied, the parameters $t_{maxO157}$ and t_{maxBM} seemed to be very similar. Hence, BM and O157 data were globally fitted by using model 4 with a common t_{max} for the two microfloras. No significant difference was found between model 3 (full model) and model 4 (partial model) in terms of the RSS for any of the protocols ($P > 0.05$, as determined by an F test). Figure 1 shows that growth data are well described by model 4, indicating that O157 growth stopped as soon as BM growth reached the maximal level. Moreover, it is worth noting that the maximal level

of BM growth was almost constant from one protocol to another (8.62 to 8.86 \log_{10} CFU ml^{-1}). The maximal levels for O157 varied from 7.28 to 8.12 \log_{10} CFU ml^{-1} according to the protocol tested. It is worth noting that at this stage of growth, the difference between the two floras was between 0.6 and 1.5 \log_{10} CFU ml^{-1} depending on the protocol considered; consequently, the O157 counts were always in the minority compared with the background microflora counted, with relative ratios from 4 to 30.

Impact of enrichment factors on BM and O157 growth parameters. As shown in Fig. 2a and b, the initial level of O157 (y_{0O157}) was not greatly influenced by the enrichment protocol tested, whereas the initial level of BM (y_{0BM}) appeared to decrease when EC was used. Indeed, a decrease of roughly 1 \log_{10} was observed for the protocols with EC compared to

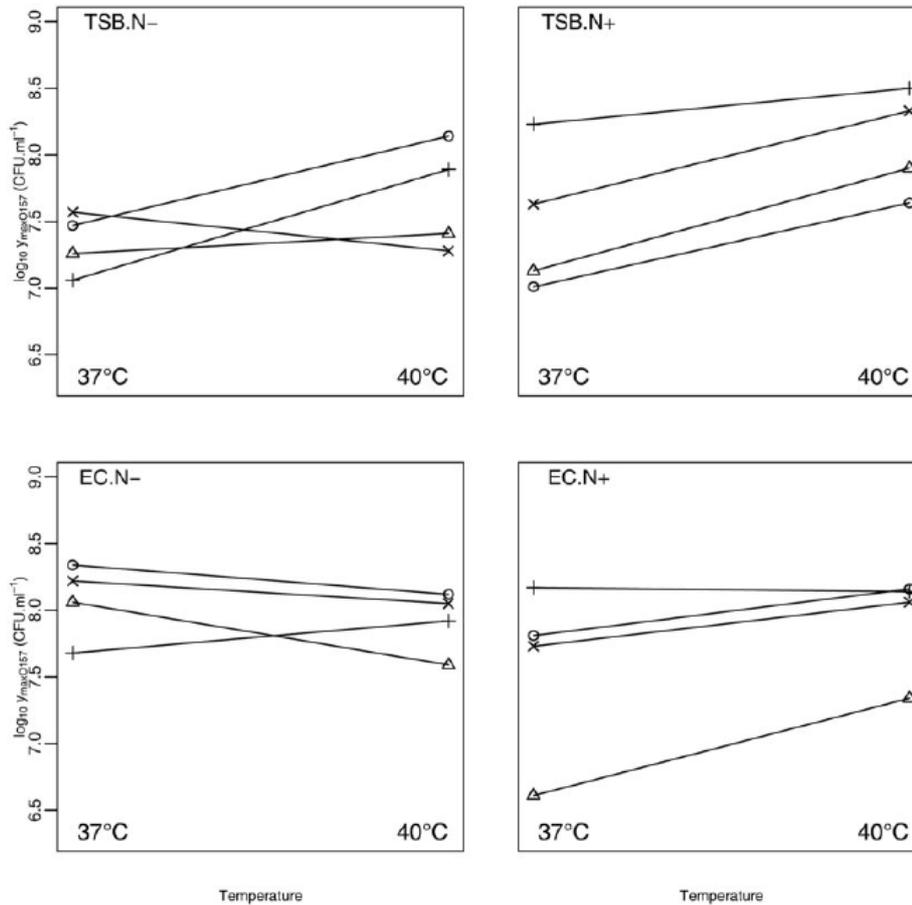


FIG. 3. Plots of $y_{\max O157}$ for the eight protocols. O, strain 1; Δ , strain 2; +, strain 3; \times , strain 4.

those with TSB. Figures 2c and d show that the different protocols had little impact on the O157 lag time (λ_{O157}), while the BM lag time (λ_{BM}) seemed to increase when novobiocin was added to the basal medium, especially for protocols with TSB. Addition of novobiocin to the basal medium had little effect on the O157 and BM maximum specific growth rates ($\mu_{\max O157}$ and $\mu_{\max BM}$) (Fig. 2e and f). Nevertheless, when no antibiotic was added, lower values of $\mu_{\max BM}$ were observed for protocols with TSB than for protocols with EC. The maximum specific growth rates of both microfloras were influenced by the temperature, and on the whole, 40°C resulted in higher μ_{\max} values. Although the t_{\max} values were lower for TSB.N- protocols than for the other protocols, this parameter was almost constant regardless of the protocol, varying between 10.0 and 11.7 h (Fig. 2g).

Impact of enrichment factors on the maximum O157 level. Only two main effects appeared to be significant in the analysis of variance: the temperature ($P < 0.01$) and the strain ($P < 0.05$). However, two first-order interactions involving these two factors also had significant effects on the maximal O157 level:

the interaction between the addition of novobiocin and the strain ($P < 0.05$) and the interaction between the basal medium and the temperature ($P < 0.05$).

As shown in Fig. 3, there was variability between the four strains of O157, but none of the four strains grew better in all the protocols. The final O157 levels were generally higher at 40°C than at 37°C, but this was not always the case for every strain and it was not generally the case for the EC.N- protocols. When the antibiotic effect was considered, the addition of novobiocin seemed to increase the variability among strains. On the whole, the differences between the various protocols were small compared to the variability between strains. Indeed, regardless of the protocol and the strain considered, the maximal level of O157 was between 6.5 and 8.5 \log_{10} CFU ml^{-1} .

DISCUSSION

Our results indicate that there is a simple competitive interaction between *E. coli* O157:H7 and the prevailing background microflora during the enrichment step for ground beef. In fact,

O157 growth stopped as soon as the level of BM reached the maximal value, which was almost constant regardless of the enrichment protocol considered. Our model was limited because it did not address other types of interactions which may take place during enrichment, but it seemed to be sufficient to describe the simultaneous growth of the two floras based on the observed data.

The present study showed that the enrichment protocol factors had little impact on the simultaneous growth of BM and O157. Indeed, the selective factors (i.e., EC and novobiocin) had only slight effects at the beginning of BM growth (on $y_{0\text{BM}}$ and λ_{BM}) but did not inhibit BM growth. The higher incubation temperature (40°C) slightly improved O157 growth, but like the other selective factors, did not reduce BM growth. The observed values for the O157 maximum specific growth rate, between 1.51 and 1.86 h⁻¹, were not very variable according to the protocol tested and were close to values reported previously for growth of *E. coli* O157:H7 in ground beef without any enrichment protocol. Tamplin et al. (56) reported μ_{maxO157} values of 2.45 and 1.79 h⁻¹ at 40°C and 35°C, respectively, in sterile irradiated ground beef samples, and Walls and Scott (61) reported a μ_{maxO157} of 1.89 h⁻¹ at 35°C in a raw ground beef sample. A comparison between these previously reported results and our results emphasized that the enrichment protocol factors, especially the selective factors, had little effect on the simultaneous growth of BM and O157. Nevertheless, other conclusions might be drawn for untested conditions, such as vacuum-packed ground beef, in which the interaction between BM and O157 might be different because of a qualitatively different background microflora (60).

The optimal length of incubation could be determined from the t_{max} , because of the relative stability of the maximal level of target bacteria after t_{max} . Our results (Fig. 2g) show that the t_{max} values ranged from 10.02 to 11.7 h, depending on the protocol considered. Thus, an incubation time of around 12 h could be recommended based on these results. Nevertheless, it is worth noting that t_{max} is dependent on the initial BM level, which may vary from one ground beef sample to another. Hence, if the initial level of BM is higher than that in our experiment, the t_{max} will be lower. For example, the parameters of model 4 obtained for the TSB.N-37 protocol allowed prediction of a t_{max} of 8 h if $y_{0\text{BM}}$ was fixed around the higher BM level observed in French food industries (5 log₁₀ CFU ml⁻¹) instead of the 4 log₁₀ CFU ml⁻¹ in our study. On the contrary, if $y_{0\text{BM}}$ is fixed around the lowest level observed in French food industries (2 log₁₀ CFU ml⁻¹), model 4 with the same enrichment protocol predicts a t_{max} of around 14 h. The optimal length of incubation may also depend on other ground beef characteristics (the kind of packaging, the physiological state of the BM, and the O157 flora).

For the final level of O157 ($y_{0\text{O157}}$), no marked differences between the enrichment protocols tested were observed (Fig. 3). It is worth noting that the final level obtained at the end of the enrichment step must be higher than the detection threshold of the screening method used for detection. Immunological methods (enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, immunochromatography, etc.), often followed by isolation of the target bacteria if there are positive results, are the main methods used for detection of *E. coli* O157:H7. Currently, the international reference method for isolation of *E.*

coli O157:H7 is the IMS method (ISO EN 16654). The IMS protocol consists of a 6-h enrichment step at 42°C, followed by an immunocentrifugation step (using immunomagnetic beads coated with anti-O157 antibody) and finally by a detection step (using plating medium [i.e., sorbitol MacConkey agar]). With no prior enrichment step at least 3.5 to 4.4 log₁₀ CFU of *E. coli* O157:H7 g⁻¹ of sample is required for detection of the bacteria after immunomagnetic separation combined with detection methods (26, 27, 28). Genetic methods, like PCR, are also used, but to a lesser extent. The PCR detection threshold with no prior enrichment step that has been reported previously is 3 log₁₀ CFU g⁻¹ (20, 63).

Figure 3 shows that all the protocols tested allowed, after 24 h, O157 to reach levels higher than PCR and IMS-DM detection thresholds. However, for the enrichment protocols with novobiocin and incubation at 37°C, the y_{maxO157} values obtained after 6 h of incubation scarcely reached the IMS-DM detection threshold. Nevertheless, in the IMS method (ISO EN 16654), incubation for 6 h is recommended for isolation of *E. coli* O157:H7.

Moreover, it must be emphasized that y_{maxO157} obviously depends on the initial O157 level in ground beef ($y_{0\text{O157}}$). The initial O157 inoculum (0.6 log₁₀ CFU ml⁻¹) was relatively large in our study because of experimental limits. However, Crowley et al. (19) reported sporadic counts of *E. coli* O157:H7 in ground beef products, and the average count was 0.91 log₁₀ CFU g⁻¹. By taking into account the 10-fold dilution carried out at the beginning of the enrichment protocol (i.e., 25 g of sample transferred into 225 ml of basal medium), the concentration corresponded to a $y_{0\text{O157}}$ value of around -0.09 log₁₀ CFU ml⁻¹. Predictions made by model 4 with this realistic value for $y_{0\text{O157}}$ gave final O157 levels ranging from 6.3 to 7.7 log₁₀ CFU ml⁻¹ for the eight protocols tested. When the levels of O157 obtained after 6 h of enrichment were determined, the predicted values varied between 2.9 and 3.7 log₁₀ CFU ml⁻¹. In this case, based on data close to reality, the PCR detection threshold would thus be reached regardless of the protocol and the length of enrichment, whereas for all protocols the IMS-DM threshold of detection would be not reached after the recommended incubation period (6 h).

Moreover, other data have been reported, and Shinagawa (53) found that a level of 4 CFU in 25 g of food caused a food-borne disease in a Japanese school in 1996. When the 10-fold dilution carried out at the beginning of the enrichment protocol was taken into account, this corresponded to a $y_{0\text{O157}}$ of around -1.8 log₁₀ CFU ml⁻¹. Predictions made by model 4 with this realistic value for $y_{0\text{O157}}$ gave final O157 levels ranging from 1.2 to 2 log₁₀ CFU ml⁻¹ and from 4.6 to 5.6 log₁₀ CFU ml⁻¹ after 6 and 24 h of enrichment incubation, respectively. In this case, in which the initial level of contamination by *E. coli* O157:H7 was low, the predictions showed that the y_{maxO157} values obtained after 6 h of enrichment would be lower than the PCR and IMS-DM detection thresholds. Hence, some false-negative results could be obtained after the IMS analysis, for which only 6 h of incubation is recommended (ISO EN 16654). For an enrichment with 6 h of incubation before detection by PCR, some false-negative results could be also obtained (20, 34).

In addition, healthy exponential-phase O157 cells were used in our study, but in reality the cells could be starved, desic-

cated, stressed, or in the stationary phase (59). Natural O157 contaminants may behave in a different way. However, Whiting and Bagi (62) reported that exponential-phase cells of *Listeria monocytogenes* had the shortest lag phase compared to cells grown under unfavorable conditions. The lag phase was also extended when the inoculum size was very small (3). Hence, the last predictions obtained with model 4 (based on fitting our experiment data) could overestimate the O157 level obtained after 6 or 24 h. It is worth noting that when the background microflora level was higher than that in our experiment, the IMS-DM and PCR threshold of detection could scarcely be reached even after 24 h of enrichment.

The length of the enrichment step is currently being reduced more and more in order to obtain more rapid methods for isolation of *E. coli* O157:H7. However, the last predictions showed that 6 h of enrichment is not sufficient to reach the detection thresholds of numerous screening methods. In order to evaluate the optimal length of incubation, the IMS-DM and PCR detection limits after a 6-h enrichment step were estimated by using model 4. Depending on the protocol, the predicted values varied from 2 to 9 CFU ml⁻¹ for PCR and from 18 to 93 CFU ml⁻¹ for IMS-DM. These values are consistent with those obtained previously after 6 h of enrichment at 37°C (20, 28, 29). Moreover, if the length of incubation varies from 6 to 10 h, the predicted PCR and IMS-DM detection limits are decreased by roughly 3 log₁₀ and vary from -3 to -4 log₁₀ CFU ml⁻¹ for PCR and from -2 to -3 log₁₀ CFU ml⁻¹ for IMS-DM. Hence with prior enrichment for 10 h, samples with a low initial level of O157 (-1.8 log₁₀ CFU ml⁻¹) would be detected. Since the *t*_{max} values range from 10.02 to 11.7 h depending on the protocol considered, it does not seem useful to further increase the incubation temperature, and 10 to 12 h appears to be the optimal length of enrichment for ground beef.

Model 4 allowed us to predict the simultaneous growth of *E. coli* O157:H7 and background microflora in other conditions which were not tested (i.e., low initial O157 level and high initial BM level) and thus to propose recommendations concerning the optimal incubation period. In the present study we obtained results and drew conclusions for non-vacuum- and non-modified-atmosphere-packed ground beef, but more experiments should be carried out with ground beef in various packaging. Indeed, vacuum- or modified-atmosphere-packed ground beef might contain other background microfloras, and consequently the interactions between *E. coli* O157:H7 and the background microflora could be other types of interactions. For instance, in vacuum-packed ground beef, the *Lactobacillus* flora in the background microflora is more important. Thus, antimicrobial metabolites, acids, and bacteriocins produced by the *Lactobacillus* flora may involve another type of interaction with *E. coli* O157:H7.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ammara Beddiaf, Christine Mazuy, and Magalie Berardin for preparation of part of the experiment. We also thank Marie Cornu and Valérie Livrelli for constructive counsel and Richard Sullivan for coaching in English.

This work was supported by the French Food Safety Agency (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France).

REFERENCES

- Aldus, C., A. Van Amerongen, R. M. Ariens, M. W. Peck, J. H. Wichers, and G. M. Wyatt. 2003. Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 95:380-389.
- Atalla, H., R. Johnson, S. McEwen, R. Osborne, and C. Gyles. 2000. Use of a Shiga toxin (Stx)-enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing *Escherichia coli* from naturally contaminated beef. *J. Food Prot.* 63:1167-1172.
- Augustin, J. C., A. Brouilland-Delattre, L. Rosso, and V. Carlier. 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1706-1710.
- Bates, D. M., and D. G. Watts. 1998. Nonlinear regression and its applications. John Wiley & Sons Inc, New York, N.Y.
- Baty, F., J. P. Flandrois, and M. L. Dellignette-Muller. 2002. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5816-5825.
- Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffin, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr, C. A. Bartleson, J. H. Lewis, T. J. Barrett, and J. G. Wells. 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.
- Beutin, L., M. A. Montenegro, I. Orskov, F. Orskov, J. Prada, S. Zimmermann, and R. Stephan. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2559-2564.
- Boer, E. D. 1998. Update on media for isolation of *Enterobacteriaceae* from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 45:43-53.
- Bouvet, J., and C. Vernozy-Rozand. 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.
- Breidt, F., and H. P. Fleming. 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3159-3165.
- Buchanan, R. L., R. C. Whiting, and W. C. Damert. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.* 14:313-321.
- Carlin, F., C. Nguyen-The, and C. E. Morris. 1996. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *J. Food Prot.* 59:698-703.
- Catarama, T. M. G., K. A. O'Hanlon, G. Duffy, J. J. Sheridan, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 2003. Optimisation of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *J. Appl. Microbiol.* 95:949-957.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers—Colorado, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46:777-778.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef—United States, June-July 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51:637-639.
- Chapman, P. A., C. A. Siddons, D. J. Wright, P. Norman, J. Fox, and E. Crick. 1992. Cattle as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.* 131:323-324.
- Cornu, M., M. Kalmokoff, and J. P. Flandrois. 2002. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.* 73:261-274.
- Cowden, J., S. Ahmed, M. Donaghy, and A. Riley. 2001. Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol. Infect.* 126:335-341.
- Crowley, H., C. Cagney, J. J. Sheridan, W. Anderson, D. A. McDowell, I. S. Blair, R. H. Bishop, and G. Duffy. 2005. *Enterobacteriaceae* in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiol.* 22:409-414.
- Cui, S., C. Schroeder, D. Zhang, and J. Meng. 2003. Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Appl. Microbiol.* 95:129-134.
- Dodd, C., M. Sanderson, J. Sargeant, T. Nagaraja, R. Oberst, R. Smith, and D. Griffin. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in Midwestern feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5243-5247.
- Dogan, H., H. Kuleasan, I. Cakir, and A. Halkman. 2003. Evaluation of increased incubation temperature and cefixime-tellurite treatment for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from minced beef. *Int. J. Food Microbiol.* 87:29-34.
- Duffy, G., R. C. Whiting, and J. J. Sheridan. 1998. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16:299-307.
- Feldsine, P. T., D. E. Kerr, S. C. Letung, A. H. Lienau, S. M. Miller, and L. A. Mui. 2002. Assurance enzyme immunoassay eight hour method for detection

- of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in raw and cooked beef (modification of AOAC Official Method 996.10): collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 85:1037-1044.
25. Foster, G., G. Hopkins, G. Gunn, H. Ternent, F. Thomson-Carter, H. Knight, D. Graham, V. Edge, and B. Synge. 2003. A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* O157 from bovine faeces. *J. Appl. Microbiol.* 95:155-159.
 26. Gehring, A., J. Brewster, P. Irwin, S. Tu, and L. V. Houten. 1999. 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* 27:469.
 27. Gehring, A. G., D. L. Patterson, and S. I. Tu. 1998. Use of a light-addressable potentiometric sensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* 258:293-298.
 28. Gehring, A. G., P. L. Irwin, S. A. Reed, S. I. Tu, P. E. Andreotti, H. Akhavan-Tafti, and R. S. Handley. 2004. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Immunol. Methods* 293:97-106.
 29. Gilgen, M., P. Hubner, C. Hofelein, J. Luthy, and U. Candrian. 1998. PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res. Microbiol.* 149:145-154.
 30. Gimenez, B., and P. Dalgaard. 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96:96-109.
 31. Gonthier, A., V. Guérin-Faubleé, B. Tilly, and M. L. Delignette-Muller. 2001. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:352-356.
 32. Grif, K., M. Dierich, and F. Allerberger. 1998. Dynabeads plus 3 M Petrifilm HEC versus Vitek Immunodiagnostic assay system for detection of *E. coli* O157 in minced meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:199-204.
 33. Griffin, P., and R. V. Tauxe. 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.
 34. Hanlon, K. O., T. Catarame, G. Duffy, I. Blair, and D. McDowell. 2004. RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96:1013-1023.
 35. Ihaka, R., and R. Gentleman. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.* 5:299-314.
 36. Karch, H., and T. Meyer. 1989. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1180-1186.
 37. Keene, W. E., J. M. McNulty, L. P. Williams, K. Hedberg, and D. W. Fleming. 1993. A two-restaurant outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis associated with the consumption of mayonnaise. *Abstr. 33rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, p. 354.
 38. Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda. 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 37:543-548.
 39. Lionberg, W., L. Restaino, E. Frampton, and W. Barbour. 2003. Efficacy of enrichment broths in the recovery of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef by PCR. *J. Food Prot.* 66:1911-1915.
 40. Malakar, P. K., D. E. Martens, M. H. Zwietering, C. Beal, and K. Van't Riet. 1999. Modelling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*. II. Mixed cultures and shelf life predictions. *Int. J. Food Microbiol.* 51:67-79.
 41. Manafi, M., and B. Krensmajer. 2001. Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Int. J. Food Microbiol.* 71:257-262.
 42. McDonough, P., C. Rossiter, R. Rebhun, S. Stehman, D. Lein, and S. Shin. 2000. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York state and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. *J. Clin. Microbiol.* 38:318-322.
 43. McKellar, R. C., and X. Lu. 2004. Primary models, p. 21-62. *In* R. C. McKellar and X. Lu (ed.), *Modelling microbial responses in food*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
 44. Nauta, M. J., and J. Dufrenoy. 1999. Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol.* 1:137-155.
 45. Orr, P., B. Lorenz, R. Brown, R. Kielly, B. Tan, D. Holton, H. Clugstone, L. Lugtig, C. Pim, and S. MacDonald. 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis.* 26:675-684.
 46. Ostroff, S. M., P. M. Griffin, R. V. Tauxe, L. D. Shipman, K. D. Greene, J. G. Wells, J. H. Lewis, P. A. Blake, and J. M. Kobayashi. 1990. A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Washington State. *Am. J. Epidemiol.* 132:239-247.
 47. Pavia, A. T., C. R. Nichols, D. P. Green, R. V. Tauxe, S. Mottice, K. D. Greene, J. G. Wells, R. L. Slegler, E. D. Brewer, and D. Hannon. 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.
 48. Pin, C., and J. Baranyi. 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 41:59-72.
 49. Proctor, M. E., T. Kurzynski, C. Koschmann, J. R. Archer, and J. P. Davis. 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.
 50. Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
 51. Ryan, C. A., R. V. Tauxe, G. W. Hosek, J. G. Wells, P. A. Stoesz, H. W. McFadden, P. W. Smith, G. F. Wright, and P. A. Blake. 1986. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J. Infect. Dis.* 154:631-638.
 52. Senne, M. M., and S. E. Gilliland. 2003. Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage micro-organisms in fresh meat systems. *J. Food Prot.* 66:418-425.
 53. Shinagawa, K. 1997. Correspondance and problem for enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka City, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* 46:104-112.
 54. Smith, K., E. Swanson, E. Wagstrom, F. Leano, D. Boxrud, J. Adams, J. Besser, R. Danila, and H. F. Hull. 2002. Three outbreaks of *E. coli* O157 infections due to retail ground beef in Minnesota, 2000: detection, investigation and characteristics, p. 167-168. *Abstr. 3rd International Conference of Emerging Infectious Diseases*, March 2002, Atlanta, Ga.
 55. Tamplin, M. 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10 degrees C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *J. Food Prot.* 65:1535-1540.
 56. Tamplin, M. L., G. Paoli, B. S. Marmer, and J. Phillips. 2005. Models of the behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46°C. *Int. J. Food Microbiol.* 15:335-344.
 57. Tarr, P. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 20:1-8.
 58. Tutend, A., D. Pierard, J. V. Hoof, and L. D. Zutter. 2003. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. *J. Food Prot.* 66:1564-1569.
 59. Uyttendaele, M., C. Granette, F. Rogerie, S. Pasteau, J. Debevere, and M. Lange. 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.
 60. Vold, L., A. Holck, Y. Wasteson, and H. Nissen. 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 56:219-225.
 61. Walls, L., and V. N. Scott. 1996. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Prot.* 59:1331-1335.
 62. Whiting, R. C., and L. K. Bagt. 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 73:291-295.
 63. Witham, P. K., C. T. Yamashiro, K. J. Livak, and C. A. Batt. 1996. A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1347-1353.



PUBLICATION N°3



Growth of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols

A. Vimont^{1*}, C. Vernozy-Rozand, MP. Montet, C. Bavai, B. Fremaux and M.-L. Delignette-Muller

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP 83, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

Running headline: STEC AND FECES FLORA IN ENRICHMENT

¹ Correspondence to : **Antoine VIMONT, UMAP, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France. Tel.: +33-4-78-87-25-50; fax: +33-4-78-87-25-54 ; e-mail address: a.vimont@vet-lyon.fr**

Abstract

Cattle are an important reservoir for STEC and consumption of food contaminated with faecal material is a frequent source of human STEC infection. It is thus essential to reliably determine the prevalence of contamination of cattle by STEC. Currently, different enrichment protocols are used before the detection of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in faecal samples. However, there have not been any studies performed that have compared the effectiveness of these various enrichment protocols for the growth of non-O157 STEC in faecal samples. The objective of this present study was to characterize the effects of different enrichment factors on the simultaneous growth of the feces background microflora (BM) and two non-O157 STEC strains. The different factors studied were the basal medium (TSB and EC), the effect of novobiocin in the broth (N+ or N-) and the incubation temperature (37°C or 40°C). The BM and STEC growth data were simultaneously fitted by using a competitive growth model. The STEC final levels obtained after 24h were higher for the protocols with novobiocin and/or EC compared to the others. However, novobiocin inhibited the growth of one STEC strain. We observed that the addition of novobiocin into broths is not advisable for optimal growth conditions. Moreover, given high BM and low STEC levels often observed in feces, predictions made with the growth model highlighted that false negative results could more likely appear with protocols using TSB without novobiocin than with protocols using EC. In conclusion, the use of EC broth in enrichment protocols seems to be more appropriate for detecting non-O157 STEC from bovine faecal samples. This can help avoid false negative results that cause an underestimation of the STEC prevalence in cattle.

Keywords: *Escherichia coli*; STEC; bovine feces background microflora; enrichment protocol; competitive growth model.

1. Introduction

Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are a significant public health threat in many industrialized countries (World Health Organization, 1998). Cattle are the primary reservoir for STEC, and human diseases are most often associated with consumption of food or water contaminated by cattle manure (Bopp et al., 2003). Although, *E. coli* O157:H7 is currently the predominant STEC serotype associated with human disease (Acheson and Keusch, 1996), non-O157 strains (such as O26, O111, O55, O103) are also a potential human

health risk, and some outbreaks caused by non-O157 strains have been reported in the literature (Arthur et al., 2002; Espié et al., 2006).

Several studies were carried out on bovine faecal samples to evaluate STEC prevalence in order to monitor STEC emergence and its implication in faeces-contaminated food and drinking water (Furuhata et al., 1999; Cobbold and Desmarchelier, 2000). Different methods of screening for STEC are currently available (e.g. PCR, IMS, ELISA), and most of them require an enrichment step in order to increase their ability to detect low levels of STEC (Boer, 1998; Cui et al., 2003).

Several types of enrichment protocols characterized by different factors are currently used for the growth of STEC. The main enrichment protocol factors are the enrichment broth (basal medium), the addition of selective ingredients, the temperature and the duration of the incubation period. In the literature, Vimont et al. (2006) reported that the most frequently used enrichment broths are the Trypticase Soy Broth [TSB] (39.3%) and the *E. coli* broth (which contains bile salts) [EC] (25.3%). Moreover, the study reported that at least one antibiotic is often added into the enrichment broths (in 60% of cases), and that novobiocin is the most commonly used antibiotic (in 89.3% of cases). The authors also pointed out that in 51% of cases, the enrichment broths are incubated between 16 to 24 hours, and incubated mainly at 35-37°C (in 63% of cases). Nevertheless, some authors have reported an optimal growth temperature of non-O157 strains around 41°C (Gonthier et al., 2001). However, no study has compared the effectiveness of these various enrichment protocols for the growth of non-O157 STEC in fecal samples (Vimont et al., 2006). Consequently, it appears difficult to compare prevalence of STEC in cattle published in different studies.

Furthermore, the enrichment step may be difficult to control because of the presence of the background microflora, which may influence the growth of STEC. However, so far there has been little information concerning the interaction between STEC and feces background microflora. It must be emphasized that with a goal of optimizing the enrichment conditions, it is essential to understand the interaction between the two floras during simultaneous growth.

The aim of the present study was to investigate the effect of different enrichment factors on the simultaneous growth of the feces background microflora and two non-O157 (STEC) transformed strains. The different factors studied were the basal medium (TSB and EC), the addition of novobiocin in broth (N+ or N-) and the incubation temperature (37°C and 40°C). In order to visualize the potential effects of these factors and thus to optimize the enrichment step, a follow up and a modeling of the simultaneous growth of the background microflora and STEC strains were performed.

2. Materials and methods

2.1. Inoculum preparation

The two STEC strains used in the present study (referred to as Strain 1 and Strain 2), were both isolated from dairy cattle feces during the course of a previous study. These strains did not belong to the serogroup O26, O157, O111 and O55 but their serotypes were not determined. However, they were characterized for the presence of gene coding virulence factors, *stx1* and *stx2* coding the shigatoxins 1 and 2 respectively, as well as *eae* and *ehx* coding intimin and EHEC-hemolysin, respectively. Strain 1 and Strain 2 were *stx1*⁻, *stx2*⁺, *eae*⁻, *ehx*⁻ and *stx1*⁺, *stx2*⁺, *eae*⁻, *ehx*⁺ respectively. These strains were electroporated in the presence of a plasmid vector pGFPuv (ClonTech) carrying ampicillin resistance and the green fluorescent protein (GFP), according to the protocol described by Delazari et al. (1998). More precisely, the transformation was carried out by setting the electroporation apparatus at 2.5 kV and 25 μ F with the pulse controller adjusted to 200 Ω . An electrical pulse of 4.7 msec was applied. 0.25 μ g of GFP-ampicillin resistance plasmid (pGFP) was added to the microcentrifuge tubes containing the bacterial cells. The plasmid and cells were mixed by pipetting, and then transferred into an Invitrogen 0.2cm cuvette. With the cuvette in the sample chamber, a pulse was applied using the indicated apparatus settings. Aliquot of 0.1 ml of the transformant suspension was spread on Brain Heart Infusion (BHI, 51009, bioMérieux) agar (M3012, Kalys) (BA) plates containing 150 μ g of ampicillin per ml (Ampicillin Sodium salt, eu0400, Euromedex) (BA-A). The resulting ampicillin resistant transformed colonies showed bright green fluorescent color when viewed with a handheld UV light (Herolab). This transformation was done in order to make the numeration of the two STEC strains among the abundant bovine feces background microflora during the growth follow up experiments easier. Moreover, it must be emphasized that no differences in behaviour was noted between the transformed non-O157 strains and their parental strains. Indeed, the incorporated plasmid did not affect the physiological characteristics of these two STEC strains; and moreover, the stability of the GFP plasmid under selective and non-selective conditions was described in a previous study carried out in our laboratory (Fremaux et al., 2006). Prior to the challenge testing, two green fluorescent colonies corresponding to each STEC transformed strain were individually grown in BHI at 37°C in order to reach late exponential growth. After 24 hours, the two cultures had yielded a density of 10⁸ CFU.ml⁻¹ and these precultures were used for the inoculation of bovine fecal samples.

2.2. Microbiological culture media

In different stages of the study, various microbiological culture media were used. Tryptone Medium (Fluka-Biochemika, Switzerland) was used for preparation of serial dilutions throughout the experiment. Tryptone Soya Broth (TSB, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and *E. coli* Broth (EC, Fluka-Biochemika, Switzerland) were tested with the addition of 20 mg.l⁻¹ novobiocin (TSB.N+, EC.N+) (Sigma, Steinheim, Germany) or without novobiocin (TSB.N-, EC.N-), for the study of the enrichment protocols. PCA (Plate Count Agar) was used as a non-selective medium for the enumeration of the feces background microflora (BM). BHI agar with ampicillin (BA-A) (150 µg.ml⁻¹) was used as a selective medium for the enumeration of STEC transformed strains visualized by the appearance under a UV light.

2.3. Feces sample inoculation

Bovine faecal samples were collected from a dairy farm located in the southeast of France. These samples which were proved to be initially STEC free, were mixed together and 25 gram portions of feces were aseptically weighed into 16 flasks and stored at 4°C for less than 24h before the experiments. The precultures of the two STEC transformed strains were serially diluted to reach a final concentration of 3 log₁₀ (CFU ml⁻¹) in fresh Tryptone Medium. One milliliter of each dilution was then individually inoculated into a series of eight different flasks containing the 25g portions of feces. After manual homogenization, the 16 flasks (8 for each strain) were stored overnight at 4°C. The content of these 16 flasks was transferred into a stomacher bag in which 225 ml of TSB.N-, or TSB.N+, or EC.N-, or EC.N+ were added according to the growth enrichment protocol. Hence, a final concentration of roughly 4 CFU of STEC per milliliter was obtained for each stomacher bag.

2.4. Enrichment protocols

Growth experiments were carried out with the two STEC strains in the presence of BM for different enrichment protocols, which were the result of the combination of two temperatures (37°C or 40°C), two basal media (TSB, EC) and the presence or absence of novobiocin (N+, N-). For this purpose, the 16 samples obtained at the end of the bovine faecal sample inoculation were stomached for 1 min and left at ambient temperature for a 40 min regeneration step.

2.5. Growth monitoring

At each sampling time (every 2 hours for the 8 enrichment protocols), the number of viable cells of BM and STEC was determined by plating 1.0 ml of the appropriate dilutions of the samples onto PCA and 0.1ml onto BA-A. After incubation, the various PCA and BA-A plates were counted so as to provide the respective BM and STEC growth data for each enrichment protocol.

2.6. Modelling of individual BM and STEC growth kinetics

Two growth models were used to fit the observed growth kinetics of both BM and STEC for the eight protocols tested. The first model is a very simple one in two phases with three parameters (Baty et al., 2002; McKellar and Lu, 2004) (model 1). It only describes the exponential and the stationary phases and does not take into account any lag phase:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t & \text{if } t < t_{\max} \\ y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t_{\max} & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (1)$$

where $y(t)$ is the bacterial density (\log_{10} (CFU ml⁻¹)) at time t (hours), y_0 is the initial bacterial density (\log_{10} (CFU ml⁻¹)), μ_{\max} is the maximum specific growth rate (hours⁻¹), and t_{\max} is the time at which the stationary phase begins, i.e. the time at which the maximum bacterial density is reached.

The second model that has four parameters, incorporates a third phase, a lag phase of duration λ (hours) (model 2). It has been described with different names and by various authors (Buchanan et al., 1997; McKellar and Lu, 2004). Curves described by this model show an abrupt transition (breakpoint) between the lag and the exponential phases:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 & \text{if } t < \lambda \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln_{10}} \right) \times (t - \lambda) & \text{if } \lambda \leq t < t_{\max} \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln_{10}} \right) \times (t_{\max} - \lambda) & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (2)$$

2.7. Global modeling of simultaneous growth of BM and STEC

A global model (model 3) for the simultaneous growth of BM and STEC is simply defined as using model 1 (without lag phase) for STEC flora along with model 2 (with lag phase) for the background flora. Model 3 is defined by seven parameters ($y_{0\text{STEC}}$, $\mu_{\max\text{STEC}}$,

$t_{\max STEC}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, $t_{\max BM}$) which may be estimated by two individual fittings of model 1 and model 2 on STEC and BM growth kinetics, or by a global fitting of model 3. A partial model nested in model 3 is also defined in the same way, but assumes a common value of t_{\max} for the two floras (model 4). This last model thus has only six parameters (y_{0STEC} , $\mu_{\max STEC}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, t_{\max}) and is based on the hypothesis according to which a potential competition exists between the two floras studied. More precisely, in model 4, the growth of each microflora is assumed to stop as soon as one microflora has reached its maximum density in the enrichment basal medium. This phenomenon has already been described and is commonly referred to as the Jameson effect (Carlin et al., 1996; Stephens et al., 1997; Pin and Baranyi, 1998; Cornu et al., 1999; Gimenez and Dalgaard, 2004).

2.8. Statistical methods

Fits of models to the BM and STEC data were performed by nonlinear regression (Bates and Watts, 1998) by using the least-squares criterion with the function nls of the R-Software (Ihaka and Gentleman, 1996). Comparisons of nested models (model 2 nested in model 1 and model 4 nested in model 3) were performed using an F test (Bates and Watts, 1998).

3. Results

3.1. Individual fits of BM and STEC growth kinetics

Figure 1 demonstrates that Strain 2 did not grow in media in which novobiocin was added (N+). For the other enrichment protocols, growth of the STEC strains was not inhibited. The STEC growth kinetics seem to be generally characterized by only two phases; an exponential phase followed by a stationary phase. When the two strains grow, model 1 was used to globally fit the data obtained for the two strains. The choice of a null lag phase for STEC data was justified by the fact that no significant difference was found between model 1 (model in two phases) and model 2 (model in three phases) in terms of the residual sum of squares (RSS) for each protocol ($p_{F \text{ test}} > 0.05$).

A similar growth kinetic was obtained with all the enrichment protocols for the background microflora growth. It is characterized by three phases, i.e., a lag phase followed by an exponential and a stationary phase. Thus in all cases, a significantly better fit of the BM growth data was obtained by model 2 than by model 1 ($10^{-5} < p_{F \text{ test}} < 0.03$).

3.2. Global fits of simultaneous growth of BM and STEC

Figure 1 shows that for each of the eight protocols studied, the parameters $t_{\max STEC}$ and $t_{\max BM}$ seem to be very close. Hence, BM and STEC data were globally fitted by model 4 with a common t_{\max} for the two microfloras. No significant difference was found between model 3 (full model) and model 4 (partial model) in terms of RSS for all the protocols ($p_{F \text{ test}} > 0.05$), except for one protocol (EC.N-.37, $p_{F \text{ test}} = 0.01$). Figure 1 also shows that growth data are well described by model 4 pointing out that the STEC strain growth is stopped as soon as BM reaches its maximal level. Moreover, it is worth noting that this BM maximal level is almost constant from one protocol to another (8.13 to 8.37 \log_{10} (CFU ml⁻¹)).

3.3. Impact of enrichment factors on BM and STEC growth

Growth inhibition of Strain 2 is observed when novobiocin was added into the enrichment basal media (TSB or EC) which would imply a potential susceptibility of Strain 2 to novobiocin (Fig. 1. and Table 1). For the other protocols, growth of the STEC strains is not inhibited and the STEC initial level ($y_{0 STEC}$) is not significantly influenced by the enrichment protocol tested where the values vary from 0.13 to 0.71 \log_{10} (CFU ml⁻¹). On the contrary, the BM initial level ($y_{0 BM}$) appears to decrease by roughly one \log_{10} for the protocols with EC (from 6.15 to 6.41 \log_{10} (CFU ml⁻¹)), compared to those with TSB (from 6.95 to 7.22 \log_{10} (CFU ml⁻¹)). Furthermore, the BM lag time (λ_{BM}) values seem to increase when novobiocin is added in the basal medium especially for protocols with TSB (Fig. 1). Finally, t_{\max} values are higher for the protocols in which selective ingredients (novobiocin and bile salts) are used compared to those using no selective ingredients at 37°C or 40°C (Fig. 1 and Table 2).

3.4. Impact of enrichment factors on the maximum STEC level

It is worth recalling that novobiocin inhibited the growth of one (Strain 2) of the two strains. However for the Strain 1, the addition of novobiocin implies a delay of the onset of the Jameson effect (t_{\max} values are higher for protocols with novobiocin than for protocols without novobiocin). This would allow for a prolonged growth of Strain 1 and thus higher $y_{\max STEC}$ values regardless of broth and temperature tested (4.08 to 4.96 \log_{10} (CFU ml⁻¹)) (Table 1). In the same way, bile salts (present in EC) also delay the onset of the Jameson effect (with an increase of t_{\max} of more than 2 hours in the absence of novobiocin), which implies $y_{\max STEC}$ values higher for protocols with EC than for protocols with TSB at 37°C or

40°C. Furthermore when novobiocin is added, the temperature has an impact on the $y_{\max STEC}$ values regardless of the basal medium. The $y_{\max STEC}$ values are higher by roughly one \log_{10} for the protocols in which 37°C is used than for those in which 40°C is used.

4. Discussion

Our results demonstrate a simple competitive interaction between non-O157 STEC and the prevailing background microflora during the enrichment step of faecal samples. In fact, STEC growth is stopped as soon as BM reaches its maximal level ($\sim 8 \log_{10}$ (CFU ml⁻¹)), which is fairly consistent regardless of the enrichment protocol used.

This present study also shows that the enrichment protocol factors have an impact on the simultaneous growth of BM and STEC strains. More precisely, the protocols with novobiocin and/or EC increased the t_{\max} values, which implied consequently higher final levels of STEC obtained after 24h of enrichment (Fig. 1). Indeed, bile salts included in EC broth delay the onset of the Jameson effect by extending λ_{BM} , and thus permit a longer growth for STEC. Nevertheless, the action of novobiocin initially directed against background microflora, could also disadvantage the STEC flora and which could then lead to false negative results. Indeed, our study displayed no detected growth of Strain 2 for the enrichment protocols in which novobiocin was added (N+). An additional experiment was thus performed in order to confirm the potential susceptibility of Strain 2 to novobiocin. The transformed Strain 2 and its parental strain were cultured on Muller-Hinton broth containing 20 mg.ml⁻¹ of novobiocin and incubated for 24h at 37°C. No growth of Strain 2 (both the transformed and the non-transformed strains) was observed. This strongly suggests that the non-O157 Strain 2 is susceptible to novobiocin (at 20mg.l⁻¹). This last result is in agreement with those reported by Uemura et al. (2003) who highlighted Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) varying from 3.13 to >100 mg.l⁻¹ for 57 strains of STEC tested. Moreover, Foster et al. (2003) demonstrated the superiority of an enrichment protocol without antibiotics for the isolation of *E. coli* O157:H7 from bovine feces. The addition of novobiocin in enrichment broths appears to be inadequate for the recovery of STEC.

The final level of STEC ($y_{\max STEC}$) obtained at the end of the enrichment step, is obviously expected to be higher than the detection threshold of the screening method used for the STEC detection. It is worth noting that no method is currently validated for detecting STEC in faecal samples. The immunological methods (ELISA, RIA, immunochromatography, and immunomagnetic separation (IMS)) often combined with detection methods, and the genetic

methods (like Polymerase Chain Reaction (PCR)) are the main methods used for the detection of STEC. With no prior enrichment step, a minimum concentration of 3.5 to 4.4 \log_{10} (CFU of STEC g^{-1} of sample) is required to allow the detection of the bacteria after the immunomagnetic separation combined with detection methods (IMS-DM) (Gehring et al., 1998; Gehring et al., 1999; Gehring et al., 2004). The PCR detection threshold with no prior enrichment step reported in the literature, is 3 \log_{10} (CFU g^{-1}) (Cui et al., 2003; Witham et al., 1996). Figure 1 shows that the protocols with TSB and EC at 37°C or 40°C without novobiocin, allowed STEC levels (after 24h of incubation) to reach the PCR and the IMS thresholds of detection.

Moreover, it must be emphasized that $y_{\max STEC}$ obviously depends on the initial STEC level in feces ($y_{0 STEC}$). The initial STEC inoculum (0.6 \log_{10} (CFU ml^{-1})) is relatively high in our study because of experimental conditions. Yet, Fukushima et al. (2004) showed that the majority of cattle infected with STEC were low-carriers that contained STEC at a concentration less than to 2 \log_{10} (CFU g^{-1}). By taking into account the 10-fold dilution carried out at the beginning of the enrichment protocol (i.e., 25g of sample transferred into 225 ml of basal media), this corresponds to an $y_{0 STEC}$ value around 1 CFU ml^{-1} . Predictions made by model 4 with this $y_{0 STEC}$ realistic value give final STEC levels from 2.3 to 2.4 \log_{10} (CFU ml^{-1}) for TSB without novobiocin at 37°C and 40°C after 24h of incubation. It is worth noting that the same levels are predicted after 6 hours (the common enrichment duration in the IMS-DM detection protocol of non-O157 STEC and *E. coli* O157:H7 in food), since the t_{\max} values are lower than 5 hours. When the initial level of contamination by STEC is low, the predictions show that the $y_{\max STEC}$ values obtained after 6 and 24h of enrichment, would be lower than the PCR and IMS-DM detection thresholds. In the same way, predictions made by model 4 with an $y_{0 STEC}$ value around 0 \log_{10} (CFU ml^{-1}) for EC without novobiocin at 37°C and 40°C after a 6h enrichment step, give $y_{\max STEC}$ values (from 2.6 to 2.9 \log_{10} (CFU ml^{-1})) lower than the IMS-DM detection threshold. However given higher t_{\max} values for the protocols with EC, $y_{\max STEC}$ values after 24h of incubation (from 3.2 to 3.4 \log_{10} (CFU ml^{-1})) would reach the PCR detection threshold and get closer to the IMS-DM detection threshold.

Given the high BM level observed in our fecal bovine samples, the t_{\max} values for protocols with TSB.N- (37 and 40°C) are therefore low (< 5 hours). In this case, it is not useful to increase the duration beyond 5-6 hours and predictions showed that false negative results could be obtained when the STEC level of contamination is low. However, the predictions highlight that the protocols with EC.N- seem to be more effective than the protocols with TSB.N- for the enrichment of low STEC contamination levels because the t_{\max} values for EC.N- are higher (> 2.5 hours) than those for TSB.N- (Table 2).

In several studies fecal samples have been used to report prevalence of STEC in cattle. The percentage of STEC in cattle feces ranged from 6% in a US study (Cray et al., 1996) to 71% in a French study (Pradel et al., 2000). The difference of prevalence between countries could be due to different reasons, some of which were discussed in the present study. Indeed, we have demonstrated that the current enrichment protocols are sometimes inadequate. In addition, some use novobiocin that may inhibit the growth of the target STEC strain, and other protocols may be insufficient to enable a low initial level of the target strain to reach detection threshold because of the competition with background microflora. Yet, in winter low levels of STEC are excreted (Besser et al., 1997) and potential underestimation of the STEC percentage in cattle could be made.

It will be necessary to perform additional experiments with more bovine faecal samples (from different cattle), various STEC serotypes and STEC stressed cells in order to confirm the present results and especially the effectiveness of enrichment protocols with EC broth.

Acknowledgements

We thank Mrs. Ammara Beddiaf for preparation of part of the experiment. We thank Mrs. Marie Cornu and Mrs. Valérie Livrelli for their constructive advice, and Mr. Richard Sullivan for his help with English. This work was supported by the French Food Safety Agency (AFSSA; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France).

References

- Acheson, D., Keusch, G., 1996. Which Shiga toxin-producing types of *Escherichia coli* are important? ASM News. 62, 302-306.
- Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol. Rev. 18, 29-51.

- Arthur, T.M., Barkocy-Gallagher, G.A., Rivera-Betancourt, M., Koohmaraie, M., 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4847-4852.
- Bates, D., Watts, D., 1998. Non linear regression and its applications. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Baty, F., Flandrois, J.P., Delignette-Muller, M.L., 2002. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5816-5825.
- Besser, T.E., Hancock, D.D., Pritchett, L.C., McRae, E.M., Rice, D.H., Tarr, P.I., 1997. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Infect. Dis.* 175, 726-729.
- Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., 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.
- Boer, E.d., 1998. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 43-53.
- Bopp, D., Sauders, B., Waring, A., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., Dziewulski, D., Wallace, B., Kelly, M., Halse, T., Musser, K., Smith, P., Morse, D., Limberger, R., 2003. Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 41, 174-180.
- Bouvet, J., 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.
- Buchanan, R., Whiting, R., Damert, W., 1997. When is simple good enough : a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food microbiol.* 14, 313-321.
- Carlin, F., Nguyen-The, C., Morris, C., 1996. Influence of background microflora on *listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *J. Food Prot.* 59, 698-703.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet. Microbiol.* 71, 125-137.

- Cornu, M., Delignette-Muller, M.L., Flandrois, J.P., 1999. Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5322-5327.
- Cray, W.C., Jr., Thomas, L.A., Schneider, R.A., Moon, H.W., 1996. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. *Vet. Microbiol.* 53, 369-374.
- Cui, S., Schroeder, C., Zhang, D., Meng, J., 2003. Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Appl. Microbiol.* 95, 129-134.
- Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H., Cliver, D.O., 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.
- Dodd, C., Sanderson, M., Sargeant, J., Nagaraja, T., Oberst, R., Smith, R., Griffin, D., 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in Midwestern feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5243-5247.
- Duffy, G., Whiting, R.C., Sheridan, J.J., 1998. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food microbiol.* 16, 299-307.
- Foster, G., Hopkins, G., Gunn, G., Tement, H., Thomson-Carter, F., Knight, H., Graham, D., Edge, V., Syngé, B., 2003. A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* O157 from bovine faeces. *J. Appl. Microbiol.* 95, 155-159.
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A., Vernozy-Rozand, C., 2006. Growth and survival of non O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in cow manure. *J. Appl. Microbiol.* In press
- Fukushima, H., Gomyoda, M., 1999. Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, food and environmental samples. *Zentralbl. Bakteriologie* 289, 285-299.
- Fukushima, H., Seki, R., 2004. High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 189-197.
- Furuhata, K., Sakata, S., Okamoto, T., Yamamoto, S., Honda, M., Kai, A., Itoh, T., Hara, M., Tabuchi, K., Fukuyama, M., 1999. Prevalence and serotypes of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolates from dairy cattle. *Kansenshogaku Zasshi.* 73, 445-450.

- Gehring, A.G., Patterson, D.L., Tu, S.I., 1998. Use of a light-addressable potentiometric sensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* 258, 293-298.
- Gehring, A., Brewster, J., Irwin, P., Tu, S., Houten, L.V., 1999. 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* 27, 469.
- Gehring, A.G., Irwin, P.L., Reed, S.A., Tu, S.I., Andreotti, P.E., Akhavan-Tafti, H., Handley, R.S., 2004. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Immunol. Methods.* 293, 97-106.
- Gimenez, B., Dalgaard, P., 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109.
- Gioffré, A., Meichtri, L., Miliwebsky, E., Baschkier, A., Chillemi, G., Romano, M., Estani, S.S., Cataldi, A., Rodriguez, R., Rivas, M., 2002. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina. Evaluation of two procedures. *Vet. Microbiol.* 87, 301-313.
- Gonthier, A., Guérin-Faubleé, V., Tilly, B., Delignette-Muller, M.L., 2001. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 352-356.
- Griffin, P., 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.
- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 88, 450-465.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.* 5, 299-314.
- Lionberg, W., Restaino, L., Frampton, E., Barbour, W., 2003. Efficacy of enrichment broths in the recovery of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef by PCR. *J. Food Prot.* 66, 1911-1915.
- McDonough, P., Rossiter, C., Rebhun, R., Stehman, S., Lein, D., Shin, S., 2000. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York state and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. *J. Clin. Microbiol.* 38, 318-322.
- McKellar, R.C., Lu, X., 2004. Primary models. In modeling microbial responses in food. Eds. McKellar, R.C. and Lu, X. CRC Press. Boca Raton, Florida.

- Osek, J., 2002. Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 304-310.
- Phan, Q., McCarthy, T., Mschar, P., Welles, C., Howard, R., Rabatsky-Ehr, T., Hadler, J., 2002. Epidemiology of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections in Connecticut. 3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta Georgia-USA.
- Pin, C., Baranyi, J., 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 59-72.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., 2000. 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.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 83, 445-455.
- Tamplin, M., 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10 degrees C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *J. Food Prot.* 65, 1535-1540.
- Tarr, P., 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1-8.
- Tutenel, A., Pierard, D., Vandekerchove, D., Hoof, J.V., Zutter, L.D., 2003. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 94, 341-346.
- Uemura, R., Sueyoshi, M., Nagayoshi, M., Nagatamo, H., 2003. Antimicrobial susceptibilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from pigs with Edema disease in Japan. *Microbiol. Immunol.* 47, 57-61.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M.L., 2006. Isolation of *E. coli* O157:H7 and STEC non-O157 in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 102-108.
- Vold, L., Holck, A., Wasteson, Y., Nissen, H., 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 219-225.

- Witham, P.K., Yamashiro, C.T., Livak, K.J., Batt, C.A., 1996. A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1347-1353.
- World Health Organization, 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) : report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization-Berlin. Berlin, Germany.

Table 1 The maximum concentration of STEC strains 1 and 2 after each enrichment protocol, calculated as the average of the bacterial counts measured after 12h

Protocols	Strain 1	Strain 2
TSB.N-.40	2.97	3.03
TSB.N-.37	2.90	3.19
TSB.N+.40	4.08	ND [†]
TSB.N+.37	4.96	ND
EC.N-.40	3 [*]	4.16
EC.N-.37	3.69	3.39
EC.N+.40	4.27	ND
EC.N+.37	4.96	ND

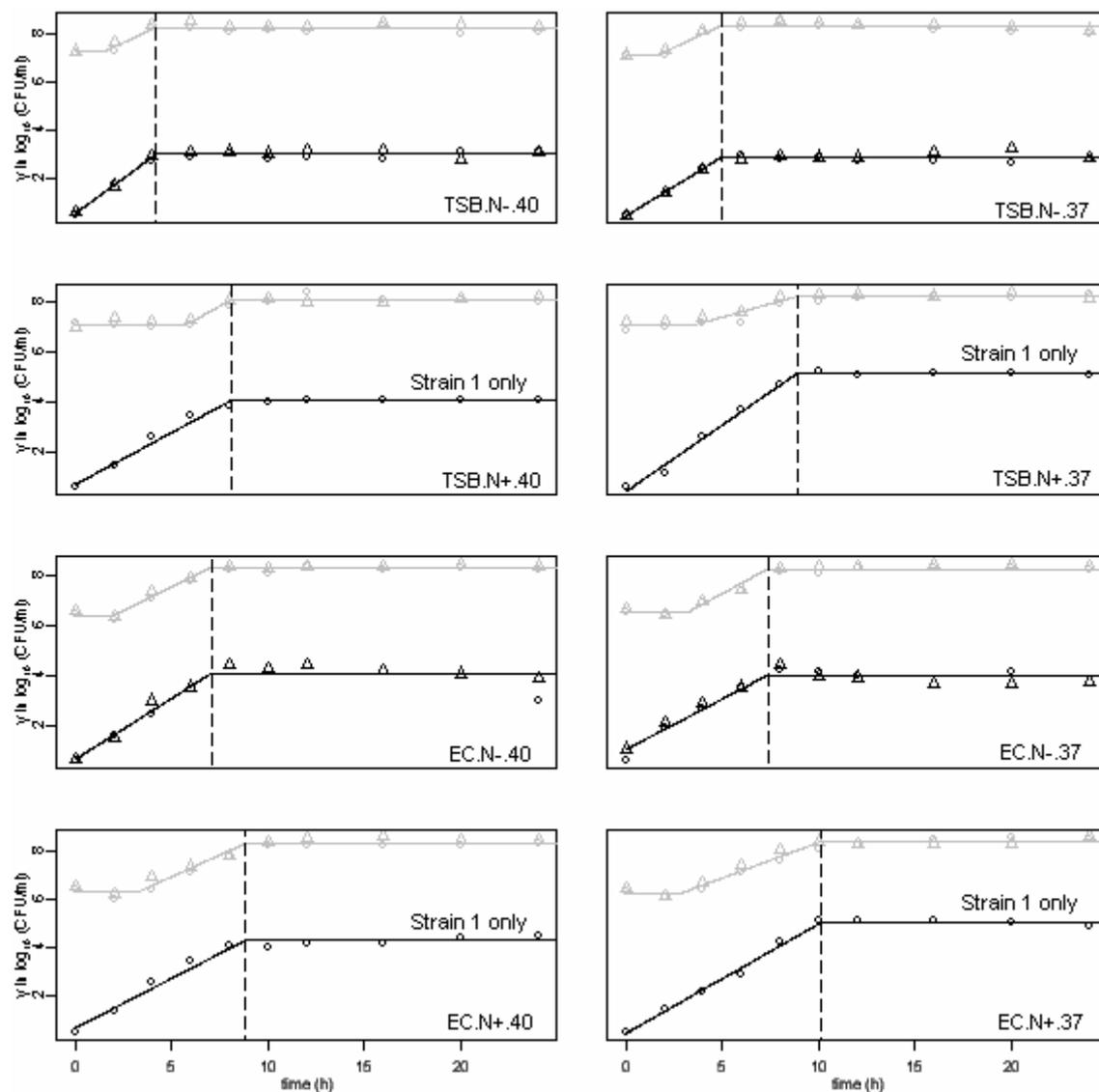
* value obtained at 24h (not calculated as an average, observations lacking for experimental reasons)

[†] Not Detected (< 4 CFU.ml⁻¹)

Table 2 t_{\max} obtained for each enrichment protocol

Protocols	t_{\max} (h)	95% confidence intervals of the t_{\max}
TSB.N-.40	4.18	3.86-4.51
TSB.N-.37	4.93	4.46-5.39
TSB.N+.40	8.1	7.68-8.52
TSB.N+.37	8.89	8.31-9.46
EC.N-.40	6.95	6.06-7.84
EC.N-.37	7.34	6.67-8.01
EC.N+.40	8.83	8.11-9.56
EC.N+.37	10.16	9.62-10.69

Fig. 1. Simultaneous growth kinetics of the two non-O157 STEC transformed strains and background microflora obtained for the eight protocols and theoretical curves obtained by fitting of model 4. \circ , Strain 1; Δ , Strain 2. The grey color (dots and curves) represents background flora data sets and the black color represents STEC data sets. The t_{max} values are represented by the vertical dotted lines.



Interférences liées à la présence de substances antibiotiques dans les milieux d'enrichissement

Publication n°4

**Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga-Toxin
Producing *Escherichia coli* (STEC) from food: a controversial use**

A. Vimont, M.-L. Delignette-Muller, and C. Vernozy-Rozand

Letters in Applied Microbiology, 2007, In Press

1. Contexte et but de l'étude

Les antibiotiques, telle la novobiocine, sont fréquemment ajoutés aux milieux d'enrichissement dans le but de favoriser la croissance des STEC en limitant la croissance de la flore annexe des échantillons investigués. L'ajout de novobiocine (20 mg.l⁻¹) dans les milieux fréquemment employés (i.e. TSB et EC) pour la recherche des *E. coli* O157:H7 dans les aliments est d'ailleurs recommandé par l'AFNOR (EN ISO 16140) et l'AOAC (OM 996 10). Néanmoins, comme souligné dans le chapitre précédent, bien que l'action de la novobiocine soit initialement dirigée contre les bactéries Gram +, cet antibiotique de la famille des aminocoumarins peut également défavoriser ou inhiber la croissance des STEC (e.g. étude N°2, Chp.1, avec l'inhibition de la croissance d'une souche de STEC non-O157 en présence de novobiocine dans le milieu). En outre, dans un autre champ disciplinaire (médecine vétérinaire), Uemura et al. (2003) avaient également mis en évidence une action de la novobiocine contre 57 souches de STEC non-O157:H7 avec des valeurs de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) parfois inférieures à 20 mg.l⁻¹ pour quelques unes d'entre elles.

Cette présente étude avait ainsi pour objectif global d'appréhender l'hypothèse selon laquelle l'utilisation de novobiocine au cours de l'enrichissement pouvait conduire à l'obtention de résultats faussement négatifs. Plus précisément, il s'agissait, dans un premier temps, de déterminer les CMI de 74 souches de *E. coli* O157:H7 et de 55 souches de STEC non-O157:H7 puis, dans un second temps, d'évaluer l'impact de la novobiocine sur la croissance des STEC (O157:H7 et non-O157:H7) pendant la phase d'enrichissement.

2. Matériels et méthodes

Les 74 souches de *E. coli* O157:H7 et les 55 souches de STEC non-O157:H7 (33 sérotypes différents) ont été isolées à partir de différents échantillons (enrichis dans de l'eau peptonée tamponnée) au cours de précédentes études épidémiologiques réalisées entre 1995 et 2005. Un descriptif détaillé de chacune des souches figure dans les Tables 1 et 2 (cf. Publication N°4). Les valeurs de CMI en novobiocine des différentes souches ont premièrement été déterminées conformément au protocole recommandé par le Comité de

l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. La CMI a été définie comme la plus faible concentration en novobiocine inhibant le développement visible des souches après 24h d'incubation à 37°C. Les différentes concentrations en novobiocine testées étaient les suivantes : 2, 4, 8, 16, 32 et 64 mg.l⁻¹.

Il convient de noter que la sensibilité des souches a également été testée à 20 mg.l⁻¹, concentration en novobiocine recommandée dans les milieux d'enrichissement pour STEC.

Dans un deuxième temps, pour chaque classe de CMI (définie à l'issue de la 1^{ère} partie de l'étude), une souche de *E. coli* O157:H7 et de STEC non-O157:H7 a été sélectionnée au hasard, soit trois souches de *E. coli* O157:H7 et quatre de STEC non-O157:H7. Un suivi de croissance des souches sélectionnées a alors été effectué dans 250ml de TSB sans novobiocine [TSB N-] et avec 20mg l⁻¹ de novobiocine [TSB N+] pendant 24h à 37°C.

Les souches étudiées ont été inoculées à une concentration de 4 UFC.ml⁻¹ dans les milieux TSB N- et TSB N+ et les dénombrements ont été réalisés à 0, 6, 12 et 24h.

3. Résultats et discussion

Cette étude a révélé que les souches de *E. coli* O157:H7 étaient significativement plus résistantes à la novobiocine que les souches de STEC non-O157:H7 (test du χ^2 , $P < 0.0001$). En effet, les valeurs de CMI varient de 32 à > 64mg.l⁻¹ pour les 74 souches de *E. coli* O157:H7 et de 16 à > 64mg.l⁻¹ pour les 55 souches de STEC non-O157:H7 (cf. Table 3, Publication N°4). De plus, 9% des souches non-O157:H7 ont une valeur de CMI égale à 16mg.l⁻¹ et 31% d'entre elles sont inhibées à 20mg.l⁻¹ (*versus* 0% pour les souches O157:H7). A l'issue des suivis de croissance dans le TSB supplémenté par 20 mg.l⁻¹ de novobiocine [TSB N+], un effet bactéricide de la novobiocine a été montré sur l'une des souches de STEC (souche 4) dont la CMI était inférieure à la concentration testée (cf. Figure 1, Publication N°4). Il est important de rappeler que cette concentration est certes recommandée par l'AFNOR et l'AOAC pour la recherche des *E. coli* O157:H7 dans les denrées alimentaires mais également fréquemment employée pour la détection des STEC non-O157:H7 dans de multiples échantillons. Ce résultat met donc en avant le risque, dans ce cas précis, d'obtenir à l'issue de l'enrichissement des résultats faussement négatifs.

Par ailleurs, cette étude révèle qu'un effet de la novobiocine sur la croissance des souches de STEC O157:H7 et non-O157:H7, ayant une CMI supérieure à 20 mg.l⁻¹, est également

observé (cf. Figure 1 & 2). L'addition de novobiocine dans le milieu entraîne un ralentissement de la croissance de ces souches (souches 1, 2, 3, 5, 6 et 7). Une différence de croissance d'environ 6 et 2 \log_{10} UFC.ml⁻¹ est par exemple observée pour la souche 3 respectivement à 12 et 24h. Ces derniers résultats laissent entrevoir également le risque d'obtenir des « faux négatifs » particulièrement lorsque la période d'incubation avant screening est courte (e.g. 6 heures pour l'IMS). En effet, la densité bactérienne atteinte par les souches de STEC O157:H7 et non-O157:H7 après 6 heures d'incubation dans le milieu TSB N+ (cf. Figure 1 & 2), est inférieure au seuil de détection de l'IMS ($\sim 4 \log_{10}$ UFC.g⁻¹). Il faut souligner, qui plus est, que les suivis de croissance des souches de STEC ont été menés en culture pure, i.e. sans la présence de flore(s) annexe(s). Or, les études précédemment évoquées dans le chapitre 1 mettent en évidence un arrêt de la croissance des STEC lorsque la flore annexe atteint sa densité maximale (effet Jameson), voire même avant, dans le cas de la matrice « lait cru » où d'autres types d'interaction interviennent. Par exemple, pour un niveau en flore annexe d'environ 5 \log_{10} UFC.g⁻¹ de steak haché, un t_{\max} de 9,5 h dans du TSB N+ est observé. Ainsi, pour cette valeur de t_{\max} , la densité atteinte par exemple par la souche 3 dans du TSB N+ s'avère inférieure au seuil de détection de l'IMS et de la PCR (cf. Figure 1). Compte tenu de l'arrêt « précoce » et du ralentissement de la croissance des souches de STEC induits respectivement par la flore annexe et la présence de novobiocine dans le milieu d'enrichissement, des résultats faussement négatifs peuvent être obtenus après détection.

Au vu des résultats de cette étude, nous suggérons de ne plus ajouter de novobiocine dans les milieux d'enrichissement destinés à la recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 dans les aliments et les matrices environnementales. En outre l'utilisation d'autres types d'agent sélectif pourrait ralentir ou inhiber la croissance des STEC lors de l'enrichissement. En effet, il a également été montré dans cette étude (résultats non exposés dans la publication N°4), que 6% des souches de STEC non-O157:H7 étaient sensibles à une concentration de 10 mg.l⁻¹ d'acriflavine. Or cette concentration recommandée par l'AFNOR pour la recherche de *Escherichia coli* O157:H7 dans le lait et les produits laitiers est aussi fréquemment employée pour la recherche des STEC non-O157:H7 dans ces mêmes matrices.



PUBLICATION N°4



ORIGINAL ARTICLE

Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use

A. Vimont, M.-L. Delignette-Muller and C. Vernozy-Rozand

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France

Keywordsenrichment protocol, *Escherichia coli*, novobiocin, O157:H7, Shiga toxin.**Correspondence**

Antoine Vimont, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France. E-mail: a.vimont@vet-lyon.fr

2006/0843: received 12 June 2006, revised 25 September 2006 and accepted 26 September 2006

doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02059.x

Abstract

Aims: To investigate the assumption that usage of novobiocin (20 mg l⁻¹) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) enrichment broths could achieve false-negative results.

Methods and Results: First, the minimum inhibitory concentration (MIC) of 74 *E. coli* O157:H7 and 55 non-O157:H7 STEC strains to novobiocin was determined. Second, to visualize the potential impact of novobiocin on the STEC growth during the enrichment step, the growth experiments were carried out in trypticase soy broth (TSB) with and without 20 mg l⁻¹ of novobiocin. The MIC values varied from 32 to >64 mg l⁻¹ for the 74 *E. coli* O157:H7 strains, and from 16 to >64 mg l⁻¹ for the 55 non-O157:H7 STEC strains. The *E. coli* O157:H7 strains were significantly ($P < 0.001$) more resistant to novobiocin than the non-O157:H7 STEC strains. The present study shows that the addition of novobiocin into enrichment broths inhibits the growth of some non-O157:H7 STEC strains, and slows down the growth of some STEC strains.

Conclusions: Enrichment broths supplemented by novobiocin could lead to false-negative results for detecting STEC from food.

Significance and Impact of the Study: We strongly suggest that novobiocin should not be systematically added into enrichment broths for detecting STEC from food.

Introduction

Escherichia coli O157:H7 and certain non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are important causes of food-borne illness, especially because of low infectious doses (Shinagawa 1997). As a result, most protocols require an enrichment step to allow the detection of these food-borne pathogens from food (Lionberg *et al.* 2003).

Antibiotics, especially novobiocin, are often added to enrichment broths in order to improve the growth of STEC by limiting the growth of background microflora (BM). Modified trypticase soy broth (i.e. TSB with bile salts and other ingredients) and modified *E. coli* broth are the two main enrichment broths used. They are often supplemented with 20 mg l⁻¹ of novobiocin as recommended by AOAC (Official Method 996-10) and the

Association Française de Normalisation (AFNOR) (EN ISO 16140) for detecting *E. coli* O157:H7 from food (aside from dairy products). Novobiocin is also often added to enrichment broths for the detection of non-O157:H7 STEC at the same concentration (Hara-Kudo *et al.* 2000; Brooks *et al.* 2001).

The use of this aminocoumarin antibiotic in enrichment broths for the detection of STEC from food is explained by its toxicity towards most gram-positive bacteria and its poor activity towards most gram-negative bacterial pathogens (Kirby *et al.* 1956; Pao *et al.* 2005). Nevertheless, Uemura *et al.* (2003) highlighted an activity of novobiocin against 57 non-O157:H7 STEC strains isolated from pigs with oedema disease and reported minimum inhibitory concentration (MIC) values lower than 20 mg l⁻¹ for some of them. Furthermore, Asakura *et al.*

(1998) and Vimont *et al.* (2006) reported lower efficiency of broths supplemented by selective ingredients (such as novobiocin) compared with nonselective broths, and little impact of novobiocin against ground beef BM.

The aim of this study was to investigate the assumption that the use of novobiocin in STEC enrichment broth could be linked to false-negative results. First, the MIC to novobiocin of 74 *E. coli* O157:H7 and 55 non-O157:H7 STEC strains was determined. Second, the growth experiments were carried out in TSB with and without 20 mg l⁻¹ of novobiocin to visualize the potential impact of novobiocin on the STEC growth during the enrichment step.

Materials and methods

The 74 *E. coli* O157:H7 and 55 non-O157:H7 (33 different serotypes) STEC strains tested in this study were collected during earlier epidemiological studies (carried out from 1997 to 2005). All the strains tested were isolated from various samples (Tables 1 and 2), enriched with buffer peptone water (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), and stored at -80°C in a glycerol-containing medium. All the strains were characterized for the presence of gene coding virulence factors, *stx1* and *stx2*, coding the Shiga toxins 1 and 2 respectively, and *eae* coding intimin (Tables 1 and 2).

The MIC values of novobiocin were determined for each strain, using the agar dilution method recommended by the AntibioGram Committee of the Microbiology French Society (Anonymous 1993). The 74 *E. coli* O157:H7 and 55 non-O157:H7 STEC strains were grown on blood sheep agar (bioMérieux) for 24 h at 37°C. The cells were suspended in Mueller Hinton (MH) broth (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and each suspension was adjusted to 0.8 Mac Farland units using a densitometer (bioMérieux). A dilution of 10⁻² was performed in MH broth and a volume of 400 µl was placed in each well of a 21-well plate. A Steers replicator apparatus (Steers *et al.* 1959) was then used to drop-inoculate the bacteria onto the MH plates containing novobiocin at the

Table 1 Virulence profiles of the 74 *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from various matrices

Origin of strains	Virulence profile			
	<i>stx1</i> ⁻ , <i>stx2</i> ⁺ , <i>eae</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺ , <i>stx2</i> ⁺ , <i>eae</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺ , <i>stx2</i> ⁻ , <i>eae</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁻ , <i>stx2</i> ⁻ , <i>eae</i> ⁺
Ground beef	15*	7	1	10
Environment	18	2	0	7
Bovine faeces	2	0	0	1
Human faeces	1	7	1	2

*Number of strain(s) for each virulence profile.

Table 2 Characterization of the 55 non-O157:H7 STEC strains

Serotype	Origin	Virulence profile
ONT:H2	Bovine effluents	1*
ONT:H2		1
ONT:H11		5**
Orough:H21		5
ONT:H21		6
ONT:H21		6
ONT:H21		2†
ONT:H39		2
O6:H10		2
O15:H21		5
O22:H8		5
O26:H11		5
O73:H31		6††
O84:H11		6
O91:H21		5
O91:H21		3‡
O91:H21		3
O113:H11		2
O113:H21		1
O113:H21		5
O113:H4	1	
O113:H4	6	
O113:H4	2	
O113:H4	2	
O117:H28	6	
O117:H28	6	
O136:H12	4§	
O145:H28	5	
O174:H2	2	
O175:H16	2	
O179:H40	2	
O179:H8	2	
O179:H8	5	
O179:H8	1	
O179:H8	1	
ONT:H19	Environment	2
ONT:H30		6
ONT:H40		4
O2:H27		2
O45:H16		2
O45:H3		2
O91:H21		5
O91:H21		7‡‡
O91:H21		5
O105:H2		6
O105:H18		6
O105:H18		4
O110:H2		2
O113:H21		1
O174:H16		1
O174:H21	2	

various concentrations. The plates were then incubated for 24 h at 37°C. The MIC was defined as the lowest concentration of novobiocin that inhibits the development of

Table 2 (continued)

Serotype	Origin	Virulence profile
O174:H21		2
O175:H16		2
O179:H8		5

stx1*⁻, *stx2*⁺, *eae*⁺.†*stx1*⁻, *stx2*⁺, *eae*⁻.‡*stx1*⁺, *stx2*⁺, *eae*⁻.§*stx1*⁺, *stx2*⁻, *eae*⁻.*stx1*⁺, *stx2*⁺, *eae*⁺.††*stx1*⁺, *stx2*⁺, *eae*⁻.‡‡*stx1*⁻, *stx2*⁻, *eae*⁻.

visible growth after 24 h of incubation at 37°C among the tested concentrations (2, 4, 8, 16, 32 and 64 mg l⁻¹).

Thereafter, for each MIC class, one strain of the *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains was randomly selected (i.e. three *E. coli* O157:H7 strains and four non-O157:H7 STEC strains). Then, a follow-up of the growth of each selected strain was carried out in 250 ml of TSB (nonselective enrichment broth; bioMérieux) with 20 mg l⁻¹ of novobiocin [TSB-N+] (Sigma, Steinheim, Germany), and without novobiocin [TSB-N-] for 24 h at 37°C. Prior to the challenge testing, each strain was grown in brain heart infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) at 37°C in order to reach the late exponential growth phase cultures, and was then individually inoculated at 4 CFU ml⁻¹ in TSB-N+ and TSB-N-. Numeration at each sampling time (0, 6, 12 and 24 h) was obtained by direct plating assay with Sorbitol MacConkey agar and by using the TEMPO EC test (bioMérieux TEMPO system) for *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC, respectively.

Results

The MIC values are displayed in Table 3. The values varied from 32 to >64 mg l⁻¹ for the 74 *E. coli* O157:H7 strains, and from 16 to >64 mg l⁻¹ for the 55 non-O157:H7 STEC strains. Thus, according to the different percentages displayed in Table 3, the *E. coli* O157:H7 strains were significantly more resistant to novobiocin

Table 3 Frequency distribution of the minimum inhibitory concentration (MIC) values of novobiocin

MIC (mg l ⁻¹)	≤8	16	32	64	>64
Relative frequencies (%) for 74 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 strains	0	0	16.2	13.5	70.3
Relative frequencies (%) for 55 non-O157:H7 strains	0	9.1	38.2	40	12.7

than the non-O157:H7 STEC strains ($P < 0.0001$ in the Chi-square test). As 20 mg l⁻¹ is the recommended concentration in the enrichment broth, the susceptibility of all the strains was also tested at 20 mg l⁻¹, and it appears that 31% of the non-O157:H7 STEC strains (vs 0% for *E. coli* O157:H7) were inhibited at this concentration.

Furthermore, by taking into account the observed MIC values, the growth follow-up of the four non-O157:H7 STEC strains (with four different MIC values: >64 [strain 1], 64 [strain 2], 32 [strain 3] and 16 mg l⁻¹ [strain 4]) and three *E. coli* O157:H7 strains (with three different MIC values: >64 [strain 5], 64 [strain 6] and 32 mg l⁻¹ [strain 7]) was carried out in order to visualize the potential effect of novobiocin on STEC growth during 24 h of incubation at 37°C.

The growth kinetics of non-O157:H7 STEC in TSB-N+ and TSB-N- are shown in Fig. 1. The effect of novobiocin in relation to the MIC value of each strain could be observed (Fig. 1). At 12 h, the addition of novobiocin in TSB induced a decrease in growth equivalent to 1 log₁₀, 2.4 log₁₀ and 5.9 log₁₀ for strains 1, 2 and 3, respectively (Fig. 1). At 24 h, this decrease in growth remained higher than 2 log₁₀ for strain 3, whereas no difference was observed for strains 1 and 2. It is worth noting that when novobiocin was added to TSB, the growth of strain 4 was inhibited from the very beginning of the enrichment step. Moreover, strain 4 was the only strain with a MIC value (16 mg l⁻¹) lower than the concentration of novobiocin (20 mg l⁻¹) used in the TSB, and therefore, novobiocin had a bactericidal effect in this particular case.

Similarly, an effect of novobiocin (related to the MIC value of each strain) could also be observed on the growth of the three *E. coli* O157:H7 strains (Fig. 2). The addition of novobiocin in TSB at 12 h has induced a decrease in growth equivalent to 1.7 log₁₀, 2.8 log₁₀ and 4.7 log₁₀ for strains 5, 6 and 7, respectively. Nevertheless, at 24 h the growth of strains 5 and 6 in TSB-N- and TSB-N+ reached almost the same maximal level (c. 8 log₁₀ CFU ml⁻¹), while a decrease in growth (>1 log) was observed for strain 7 in TSB-N+.

Discussion

The present study shows that 9% of the non-O157:H7 STEC strains had a MIC value of 16 mg l⁻¹, and that 31% of them were inhibited at 20 mg l⁻¹. These results are in agreement with those reported by Uemura *et al.* (2003) who found MIC values ranging from 3–13 to >100 mg l⁻¹ for 57 non-O157:H7 STEC strains tested. Thornsberry *et al.* (1997) also reported MIC values ranging from 16 to >64 mg l⁻¹ for 25 *E. coli* strains. Moreover, the growth experiments showed that novobiocin had a bactericidal effect against strain 4. This non-

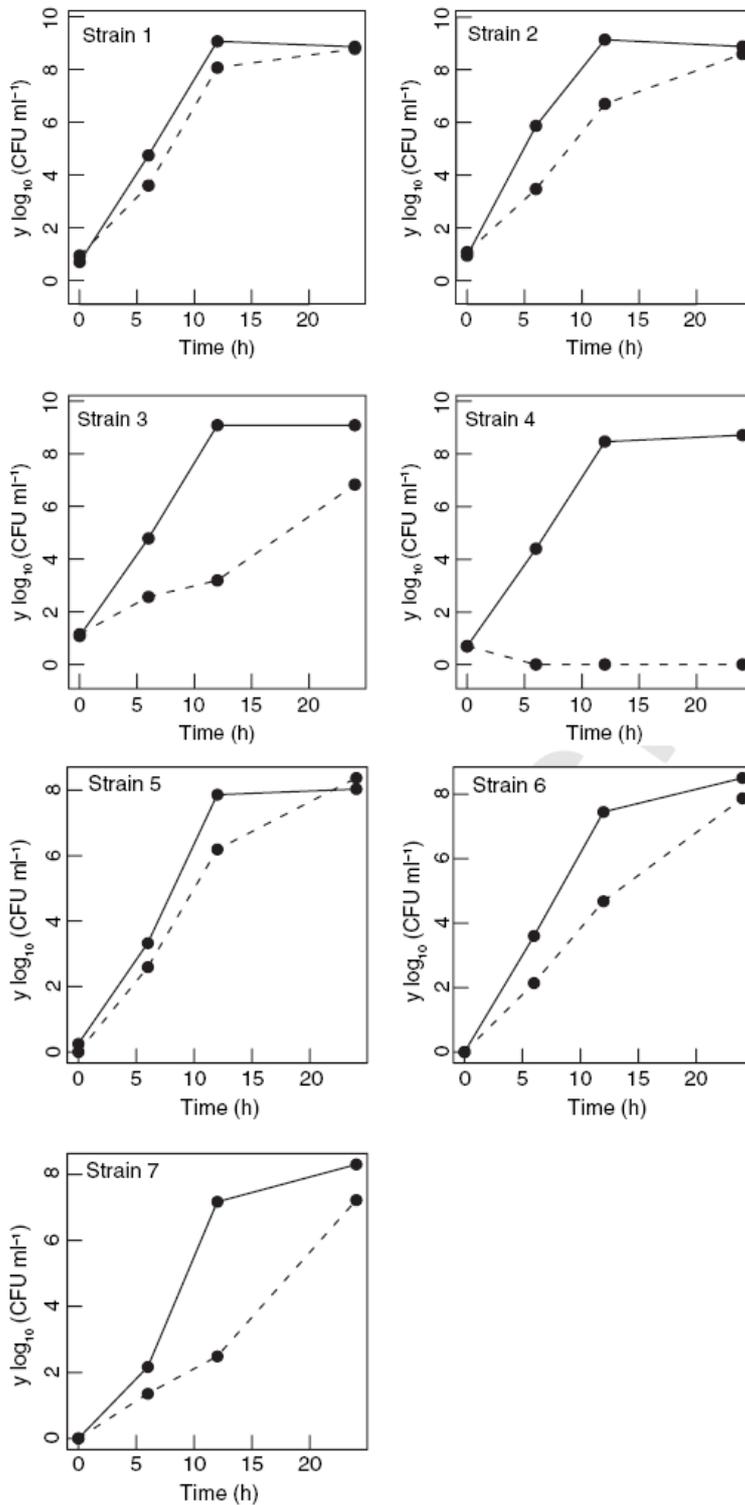


Figure 1 Growth kinetics in two broths, trypticase soy broth with novobiocin (TSB-N+) (.....) and that without novobiocin (TSB-N-) (—), of four non-O157:H7 strains of different minimum inhibitory concentration values: strain 1, >64 mg l⁻¹; strain 2, 64 mg l⁻¹; strain 3, 32 mg l⁻¹; and strain 4, 16 mg l⁻¹.

Figure 2 Growth kinetics in two broths, trypticase soy broth with novobiocin (TSB-N+) (.....) and that without novobiocin (TSB-N-) (—), of three *Escherichia coli* O157:H7 strains of different minimum inhibitory concentration values: strain 5, >64 mg l⁻¹; strain 6, 64 mg l⁻¹; and strain 7, 32 mg l⁻¹.

O157:H7 STEC strain had a MIC value lower than 20 mg l⁻¹, which is not only the concentration recommended by AOAC [Official Method 996:10] and AFNOR [EN ISO 16140] for the detection of *E. coli* O157:H7 in most of the food products, but also the main concentration used for the detection of non-O157:H7 STEC in different samples (Hara-Kudo *et al.* 2000; Brooks *et al.* 2001). Thus, some false-negative results could be obtained with strains having a MIC value lower than 20 mg l⁻¹.

Novobiocin also had an effect on the growth of both *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains for which the MIC value was higher than 20 mg l⁻¹. The addition of novobiocin in TSB slowed down the growth of such strains and a maximal growth decrease of 5.9 log₁₀ and 2 log₁₀ were observed at 12 h and 24 h, respectively. Thus, some false-negative results could also be obtained for these STEC strains, especially when incubation was performed for a short period before detection (i.e. 6 h for the IMS method [ISO EN 16654]). Yet, after 6 h of incubation, the bacterial density for all the *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains in TSB-N+ was lower than the IMS detection threshold (≈ 4 log₁₀ CFU g⁻¹) (Figs 1 and 2).

Furthermore, it is worth noting that the growth follow-up experiments were carried out in TSB (N+ and N-) in the total absence of competitive BM. Yet, we described in a previous study (Vimont *et al.* 2006) the simultaneous growth of *E. coli* O157:H7 (O157) and the ground beef BM. The BM and O157 growth kinetics were simultaneously fitted by using a competitive growth model and the simple competition highlighted between the two microflora implied that O157 growth was stopped as soon as the BM had reached its maximal bacterial density. In this study, we also observed that the time at which the stationary phase began (????) decreased obviously when the initial BM level increased, and predicted the ??? values of 8 h with the higher BM level (5 log₁₀ CFU ml⁻¹) observed in the French ground-beef industries. Yet, in the present study, after 8 h of incubation, strain 3 bacterial density in TSB-N+ was lower than the IMS and polymerase chain reaction (PCR) threshold of detection, whereas strains 2 and 6 densities scarcely reached the PCR threshold and were lower than the IMS detection threshold (Figs 1 and 2). Hence, the kinetics showed that some false-negative results could be obtained when novobiocin is added to the enrichment broths. Moreover, Vimont *et al.* (2006) pointed out a low impact of novobiocin against ground beef BM. They observed a maximal growth decrease of BM (induced by addition of novobiocin in TSB) equivalent to 0.4 log₁₀ at 12 h of incubation, whereas no difference of growth was observed at 24 h. Hence, it appears that the effect of novobiocin might be far stronger against STEC strains than against ground beef BM.

Our results are in agreement with those reported by Asakura *et al.* (1998), who pointed out that the enrichment broths without selective ingredients (such as novobiocin) were more effective than those in which the selective ingredients were added. In conclusion, we strongly suggest not adding novobiocin to the enrichment broths for the detection of *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC from food.

Acknowledgements

We thank Jean-Pierre Flandrois for his technical assistance. This work was supported by the French Food Safety Agency (AFSSA).

References

- Anonymous (1993) Recommandation n°2 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. *Bull Soc Fr Microbiol* 8, 156–161.
- 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.
- Brooks, H., Mollison, B., Bettelheim, K., Matejka, K., Paterson, K. and Ward, V. (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.
- Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Nakagawa, H. and Kumagai, S. (2000) *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Lett Appl Microbiol* 30, 151–154.
- Kirby, W.M., Hudson, D.G. and Noyes, W.D. (1956) Clinical and laboratory studies of novobiocin, a new antibiotic. *AMA Arch Intern Med* 98, 1–7.
- Lionberg, W., Restaino, L., Frampton, E. and Barbour, W. (2003) Efficacy of enrichment broths in the recovery of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef by PCR. *J Food Prot* 66, 1911–1915.
- Pao, S., Patel, D., Kalantari, A., Tritschler, J.P., Wildeus, S. and Sayre, B.L. (2005) Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. *Appl Environ Microbiol* 71, 2158–2161.
- Shinagawa, K. (1997) Correspondence and problem for enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* 46, 104–112.
- Steers, E., Foltz, E.L., Graves, B.S. and Riden, J. (1959) An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chem* 9, 307–311.

- Thornsberry, C., Burton, P.J., Yee, Y.C., Watts, J.L. and Yancey, R.J. (1997) The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. *J Dairy Sci* **80**, 413–421.
- Uemura, R., Sueyoshi, M., Nagayoshi, M. and Nagatomo, H. (2003) Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. *Microbiol Immunol* **47**, 57–61.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lazizzera, C., Bavai, C. and Delignette-Muller, M.L. (2006) Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *Appl Environ Microbiol* **72**, 261–268.

Optimisation de l'échantillonnage

Publication n°5

Optimization of the enrichment protocol for detection of *Escherichia coli* O157 in ground beef by the VIDAS *E. coli* O157 assay

A. Vimont*, C. Vernozy-Rozand, B. Mallen, C. Bavai, M. Dothal, A. Gleizal, N. Nguon
and M.-L. Delignette-Muller

Soumise à "Meat Science"

Communication n°1

Optimization of the enrichment protocol for detection of *Escherichia coli* O157 in ground beef by the VIDAS *E. coli* O157 assay

A. Vimont*, C. Vernozy-Rozand, B. Mallen, C. Bavai, M. Dothal, A. Gleizal, N. Nguon
and M.-L. Delignette-Muller

*Poster présenté lors du "6th International Symposium on Shiga Toxin -
producing Escherichia coli Infections"*

29 October-2 November 2006, Melbourne, Australia

Résultats non publiés

**Comparaison des performances de cinq types d'éponge
(méthode non-destructive) par rapport à l'excision**

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand, M. Dothal, B. Fremaux, S. Ganet, and M.-L. Delignette-Muller

1. Introduction

L

L'épisode de TIAC apparu en octobre 2005 (Mailles et al., 2006) a amené les professionnels de la viande à s'interroger sur l'efficacité des systèmes de suivi et plans de contrôle (Bonnes pratiques et HACCP) mis en place au sein de leur entreprise pour assurer la maîtrise du danger *E. coli* O157:H7. Ainsi une réflexion sur l'échantillonnage, motivée en partie par l'actualité et le contexte réglementaire (absence de critère pour les STEC dans le règlement (CE) n°2073/2005), a été menée dans le but de répondre aux attentes et interrogations des industriels. Plus précisément, il s'agissait de proposer aux industriels de la viande des protocoles qui leur permettent d'assurer au mieux l'innocuité de leurs produits, tout en tenant compte de leurs contraintes économiques et pratiques (e.g. coût et temps des analyses...). Ce travail de recherche, qui constitue la 2^{ème} grande étape de la thèse, a été réalisé au niveau des industries de transformation et au niveau de l'abattoir.

Le chapitre 3 fait état, dans une première partie, des expérimentations effectuées afin d'optimiser le protocole actuel de recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché, via la méthode VIDAS ECO (Publication N°5) puis, dans une seconde partie, des études réalisées pour optimiser la recherche des STEC sur les carcasses de bovins.

2. Prélèvement d'échantillons de steak haché

2.1 Contexte et but de l'étude

Bien que les STEC soient considérés aujourd'hui comme des pathogènes émergents importants en terme de santé publique, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune réglementation officielle, stipulant les procédures à suivre pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans le steak haché. Ainsi les divers protocoles mis en place dans les industries varient principalement en fonction de la méthode de détection utilisée, du nombre de prises d'essai effectuées et de la masse de chacune de ces prises d'essai. Il convient de noter que, lorsque des sacs stomacher à volume final constant sont utilisés, l'augmentation de la masse de haché analysée implique un accroissement du ratio « masse d'échantillon / volume de milieu ».

L'objectif global de notre étude était alors d'optimiser le protocole de recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché (ISO 16140), en augmentant la masse d'échantillon analysée et en améliorant ainsi la probabilité de détecter le pathogène recherché, d'une part, en maintenant l'exactitude des résultats et, d'autre part, en prenant en compte les contraintes des industriels de la viande (i.e. rapidité et simplicité de l'analyse, faible coût des tests...).

Il s'agissait ainsi plus précisément de tester différentes conditions d'enrichissement pour la détection d'échantillons de steak haché artificiellement inoculés avec environ 5 UFC par sac, via le VIDAS ECO. Ces différentes conditions d'enrichissement étudiées étaient le résultat du croisement des trois modalités du facteur RATIO (25g:225ml [R1/10], 75g:175ml [R1/3], 125g:125ml [R1/2]) et des deux modalités du facteur TEMPERATURE (37°C et 41.5°C). Pour chaque condition, la croissance de trois souches de *E. coli* O157:H7 a été évaluée en utilisant un seul milieu d'enrichissement : l'Eau Peptonée Tamponnée. Pour visualiser les effets potentiels de ces deux facteurs d'enrichissement sur la croissance de *E. coli* O157:H7 (O157) et de la flore annexe du steak haché (FT), un suivi simultané de la croissance de ces deux flores a été réalisé de 0 à 24h pour chaque protocole testé, en complément d'un suivi de la RFV de 6 à 14h (Relative Fluorescence Value émise après screening par le VIDAS ECO).

2.2 Matériels et méthodes

Le plan d'expérience décrit dans les lignes qui suivent a été réalisé en trois répétitions (Experiments I, II, III) à des dates différentes.

Pour chaque expérimentation, six échantillons de steak haché (15% MG) (2x25g, 2x75g et 2x125g) ont été individuellement inoculés avec une des trois souches de *E. coli* O157:H7 étudiées (Table 1, Publication N°5). *Les trois souches utilisées dans l'étude ont été isolées à partir des selles d'un patient atteint de SHU [Strain 1], de l'environnement d'un abattoir de bovins [Strain 2] et d'un échantillon de steak haché [Strain 3].* Chaque échantillon a ensuite été enrichi avec 225, 175 ou 125ml d'EPT avant d'être incubé à 37 ou 41.5°C selon le protocole étudié (cf. Table 1, Publication N°5). Les différents niveaux de contamination expérimentalement obtenus avant le début de l'incubation (t=0h) pour O157 et FT ont été déterminés pour chaque expérimentation et sont rappelés dans la Table 2 (cf. Publication N°5). Pour chacun des six protocoles testés, un suivi de croissance des trois souches O157 a été effectué en présence de la flore annexe du steak haché dans le but de déterminer les conditions optimales de croissance de *E. coli* O157:H7. Des prélèvements et dénombrements ont ainsi été réalisés toutes les 2 heures de 0 à 14h et à 24h afin de déterminer le nombre de

cellules bactériennes viables pour chacune des 2 microflores. Un suivi de la RFV obtenue pour chaque protocole a également été effectué en parallèle, en analysant une aliquote de chaque sac, toutes les 2 heures de 0 à 14h.

Comme présentées dans le Chapitre 1, les cinétiques de croissance obtenues ont été ajustées, dans un premier temps, individuellement à l'aide du modèle 1 (décrivant uniquement deux phases) et du modèle 2 (incluant une 3^{ème} phase : le lag) puis, globalement, à l'aide du modèle 3 (modèle global avec un t_{\max} propre à chaque flore) et du modèle 4 (modèle global avec un t_{\max} commun aux 2 flores) basé sur l'hypothèse d'un effet Jameson. Les ajustements obtenus ont, par la suite, été comparés en utilisant le test des modèles emboîtés (test F, cf. Publication N°5) afin de choisir le modèle décrivant le mieux les données observées.

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée dans le but de comparer, pour les divers protocoles testés, les valeurs moyennes des paramètres de *E. coli* O157:H7 (y_{0O157} , $\mu_{\max O157}$) et de la flore totale (y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$) obtenues après ajustement, ainsi que des valeurs de RFV obtenues à 6, 8 et 10h.

2.3 Résultats et discussion

Les résultats de cette présente étude montrent qu'il y a, comme observé dans l'Etude N°1, une interaction de type compétition simple entre les souches de *E. coli* O157:H7 et la flore annexe du steak haché lors de la phase d'enrichissement (Fig.1. Publication N°5). L'hypothèse d'un effet Jameson a donc, via l'utilisation d'un modèle global de croissance par compétition (modèle 4, cf. Publication N°5), également été mise en avant pour expliquer l'arrêt de la croissance de *E. coli* O157:H7 lors de l'enrichissement d'échantillons de steak haché. A la différence de l'Etude N°1, les cinétiques de croissance des souches de *E. coli* O157:H7 obtenues dans cette étude sont uniquement caractérisées par deux phases (une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire) et ont ainsi été ajustées à l'aide du modèle 1 (Fig.1. Publication N°5).

Cette étude met, par ailleurs, en évidence qu'après 8 heures d'incubation le nombre d'échantillons positifs est significativement ($P < 0.001$) plus élevé pour une température d'incubation de 41.5°C (96%) que pour une température de 37°C (48%), quelque soit le ratio testé. En outre, après 8 h d'incubation à 41.5°C, tous les échantillons sont détectés positifs pour les ratios R1/10 et R1/3 (i.e., 25g:225ml et 75g:175ml) alors que seulement 89% des

échantillons sont positifs au ratio R1/2 (i.e., 125g:125ml) (Figure 3). L'analyse de variance révèle un effet significatif ($P < 0.001$) des facteurs « RATIO » et « TEMPERATURE » sur les valeurs moyennes de RFV obtenues après 6, 8 et 10 heures d'incubation. En effet quelle que soit la température étudiée, les valeurs de RFV augmentent significativement lorsque le ratio « masse d'échantillon/volume de milieu » diminue. Ces valeurs de RFV sont supérieures à une température de 41,5°C (cf. Figure 2 et Table 3, Publication N°5).

L'analyse de variance montre, par ailleurs, un effet significatif ($P < 0.001$) des facteurs « RATIO » et « TEMPERATURE » sur le taux maximum de croissance ($\mu_{\max O157}$) de *E. coli* O157:H7 (Fig. 2b et Table 3). En effet, l'augmentation du ratio tend à diminuer les valeurs de $\mu_{\max O157}$, particulièrement pour une température d'incubation de 41,5°C. Les valeurs de $\mu_{\max O157}$ sont en outre plus élevées à 41,5°C qu'à 37°C. Les effets des facteurs « RATIO » et « TEMPERATURE » sur $\mu_{\max O157}$ semblent alors expliquer les plus faibles valeurs de RFV obtenues, d'une part, aux ratios R1/2 et R1/3 par rapport au ratio R1/10 et, d'autre part, à 37°C comparé à 41.5°C.

Ainsi, cette étude montre que, dans l'objectif commun de simplification du protocole, de réduction du temps d'analyse et d'amélioration de la recherche de O157 dans les lots de steak haché, les protocoles identifiés comme optimaux consistent à enrichir une prise d'essai de 25g ou 75g dans respectivement 225 ml ou 175 ml d'EPT pendant 8 heures à 41.5°C. Il a, en revanche, été montré que le ratio R1/2 (i.e. 125g:125ml) n'est pas un ratio optimal pour la croissance de *E. coli* O157:H7, plus particulièrement pour une température de 37°C.

Lors d'expérimentations complémentaires, la robustesse des protocoles optimaux cités ci-dessus (25g:225ml EPT et 75g:225ml EPT en 8h à 41,5°C) a été évaluée en utilisant des échantillons de steak haché artificiellement contaminés (~1 à 5 UFC/prise d'essai) et congelés préalablement 6 jours à -40°C. En effet, les souches de *E. coli* O157:H7 peuvent être stressées lors de l'analyse d'échantillons, étant donné l'utilisation d'un certain pourcentage de minerais congelés dans la fabrication du steak haché. Ces expérimentations complémentaires ont, d'une part, confirmé la détection en 8h de *E. coli* O157:H7 avec le protocole 25g:225ml EPT à 41,5°C mais ont, également, révélé l'insuffisance des 8h d'incubation pour le protocole 75g:225ml à 41,5°C et la nécessité d'augmenter cette incubation à 16-18h pour pouvoir détecter O157. *La validité du protocole 25g:225ml EPT en 8h à 41,5°C a en outre été confirmée dans des conditions réelles d'utilisation, à l'aide d'échantillons naturellement et faiblement (1UFC/25g) contaminés (résultats non exposés).*

La probabilité de détecter *E. coli* O157:H7 peut toutefois encore être augmentée en utilisant des sacs stomacher plus grands permettant par conséquent d'analyser une masse de steak haché plus importante. Ainsi, pour un niveau de contamination de 1 UFC.g⁻¹ et une prise d'essai de 375g, cette probabilité est, selon la distribution de *Poisson*, égale à 80% alors que celle-ci n'est que de 10 et 26% pour des prises d'essai de 25 et 75g. Des expérimentations analogues à celles évoquées ci-dessus ont alors été effectuées avec une prise d'essai de 375g de steak haché enrichie dans 750ml (R1/3) d'EPT à 41,5°C. Les résultats ont montré qu'une période d'incubation de 24h était nécessaire pour pouvoir détecter *E. coli* O157:H7 dans 375g de steak haché.

Les résultats de cette étude ont donc permis de suggérer trois nouveaux protocoles présentant un certain nombre d'atouts intéressants par rapport au protocole recommandé par l'AFNOR (ISO 16140) et utilisé actuellement par un grand nombre d'industriels pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché.

Le 1^{er} atout concerne la simplification du protocole : un seul milieu d'enrichissement est utilisé (EPT) à la place des 2 milieux sélectifs actuels (mTSB+N et CT-MCB). En outre, l'incubation est réalisée à une température unique de 41,5°C alors que le protocole actuel spécifie l'utilisation de 2 températures successives (42 puis 37°C) pour l'incubation des 2 milieux sélectifs. Les avantages pour l'industriel sont donc réels, avec une diminution du labeur et du coût liés à la réalisation du protocole grâce à l'utilisation d'un seul incubateur et surtout d'un seul milieu d'enrichissement non sélectif (moins coûteux). De plus, d'un point de vue scientifique, l'utilisation de l'EPT est « préférable » car, comme évoqué dans le Chapitre 2 de ce mémoire expérimental, certaines souches de *E. coli* O157:H7 peuvent être sensibles au Cefixime-Tellurite (CT) et à la novobiocine (N) ajoutés dans les 2 milieux d'enrichissement actuels. En outre, la diminution du temps global de l'analyse constitue un 2^{ème} atout considérable. En effet, ce temps passe de 30h à 8h et 18h respectivement pour les protocoles 25g:225ml et 75g:225ml. Cette réduction du temps d'analyse permet à l'industriel de simplifier le « work flow » de son entreprise en diminuant la durée des procédures libératoires de ses produits finis et ainsi, par conséquent, de réduire les coûts liés au stockage. Ces protocoles simplifiés et rapides permettent également à l'industriel d'avoir une réactivité et une flexibilité plus importante en cas de contamination des lots.

Le dernier atout (présenté uniquement par les protocoles 75g:225ml et 375g:750ml) concerne la diminution du risque pour l'industriel de laisser passer un lot contaminé sur le marché. En effet, grâce à une prise d'essai supérieure, la probabilité de détecter O157 augmente logiquement, ce qui dans le cas de mêlées faiblement contaminées, réduit considérablement le risque de laisser passer un lot contaminé. Enfin, cette prise d'essai supérieure laisse la possibilité à l'industriel de réaliser également des poolings d'échantillons (e.g. 5 échantillons de 75g en un seul échantillon composite de 375g).

En outre, d'autres contrôles complémentaires pourraient être mis en œuvre dans le but de maîtriser encore davantage le « danger STEC » dans la viande hachée. En effet, l'échantillonnage des carcasses de bovins dès la fin de l'abattage constituerait potentiellement une stratégie judicieuse et efficace pour réduire les contaminations dans les lots de steaks hachés.

Une réflexion sur cette stratégie est actuellement menée au sein de l'interprofession de la filière viande (INTERBEV) et l'étude présentée dans la partie suivante a été réalisée dans ce contexte.

3. Prélèvement d'échantillons sur carcasses de bovins

3.1 Contexte et but de l'étude

E. coli O157:H7 et les autres STEC sont introduits dans la chaîne alimentaire principalement par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. La contamination des carcasses peut avoir lieu principalement aux moments du dépouillement des cuirs (potentiellement souillés par le pathogène) et de l'éviscération (le pathogène ayant pour réservoir principal le rumen des bovins). En outre, une inter-contamination des carcasses sur la chaîne d'abattage peut également se produire via les outils utilisés par les opérateurs.

Pour prévenir la contamination des lots de haché, il s'avère ainsi judicieux de détecter les STEC dès la fin du processus d'abattage, i.e. en échantillonnant les carcasses de bovins qui serviront par la suite à la fabrication de steaks hachés.

Cependant, aucun critère microbiologique européen applicable aux denrées alimentaires pour *E. coli* O157:H7 et les autres STEC n'existe actuellement. Les procédures de contrôle microbiologique de surface des carcasses d'animaux de boucherie, définies désormais dans le règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005, concernent uniquement le dénombrement de la Flore Totale et des Entérobactéries ainsi que la détection de *Salmonella*. Les modalités de prélèvement sur carcasses de bovins décrites dans ce nouveau règlement communautaire correspondent à présent à la norme ISO 17604:2003 dans laquelle l'utilisation de méthodes destructives ou non-destructives est notifiée. Ces méthodes pourraient donc être également utilisées pour la recherche des STEC à la surface des carcasses. L'excision (méthode destructive), dont le taux de recouvrement des bactéries est supérieur à celui des méthodes non-destructives, affiche une meilleure répétabilité et reproductibilité des résultats. Néanmoins, du fait de la faible surface échantillonnée, cette méthode peut engendrer, dans le cas de la recherche de pathogène(s), l'absence de détection du pathogène cible lorsque sa présence sur la carcasse est irrégulière. Pour cette raison et étant donné la répartition irrégulière des STEC sur les carcasses, l'utilisation de méthodes non-destructives (permettant l'échantillonnage d'une surface importante de la carcasse) semblerait plus adaptée. Néanmoins, ces méthodes ont un taux de récupération des bactéries souvent variable et inférieur à l'excision. Certains auteurs (Eisel et al., 1997 ; Gill et Jones, 2000) ont montré que les quantités relatives de bactéries récupérées par chiffonnage ne représentent que 0,01 à 89% des quantités de bactéries récupérées par l'excision (considérée comme méthode de référence). Cette importante variabilité est liée à de nombreux facteurs mais la source de variabilité la plus importante est le type de matériel utilisé pour réaliser le prélèvement.

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de recouvrement de 5 types d'éponge par rapport à l'excision afin de choisir *in fine* une éponge pour la recherche des STEC à la surface des carcasses, dont le taux de récupération est proche de celui de l'excision. Pour se faire, un même site de prélèvement sur carcasse a, à la fois, été échantillonné par excision puis par chiffonnage avec une des cinq éponges testées. Les moyennes des dénombrements de la flore totale obtenus avec chaque éponge ont ensuite été comparées à celles de l'excision.

3.2 Matériels et Méthodes

3.2.1 Sites de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés au sein d'un abattoir sur différents lots de quartiers avant réfrigérés ainsi que sur différents lots de carcasses entières « chaudes » (heure d'abattage de l'animal inférieure à 2h). Pour chaque méthode (méthodes non-destructives *versus* excision), trois sites de prélèvement ont été investigués : le plat de côte (P), le collier (C), l'épaule (E) pour les quartiers avant ; le flanc (F), le collier (C) et l'épaule (E) pour les carcasses entières (Photo 8).

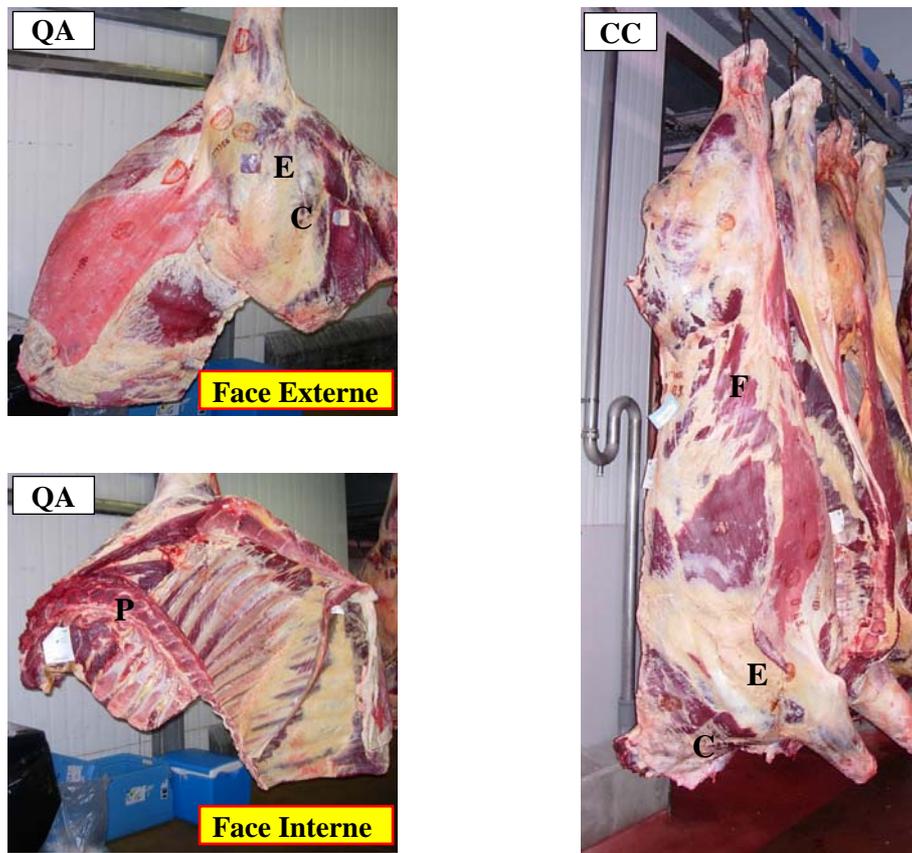


Photo 8 : Sites de prélèvement sur quartiers avant (QA) et carcasses chaudes (CC).

3.2.2 Matériels utilisés

Les prélèvements par excision ont été réalisés à l'aide d'un guide de 50 cm², d'un scalpel et de pinces stériles. Cinq types d'éponge (EB, EN, ES, EA, EAC) ont été utilisés pour effectuer les prélèvements par méthode non-destructive : EB (MegaReg Cattle Kit, BIOTRACE, Villeneuve-La-Garenne), EN (Whirl-Pak, Nasco, Modesto, Californie), ES

(Chiffonnette, SodiBox, Pont-Aven), EA (Abrasif), EAC (Abrasif +Chiffonnette) (Photo 9). Un guide de 100 cm², 25ml de diluant, un sac et des gants stériles ont également été nécessaires pour la réalisation des prélèvements par méthode non-destructive.

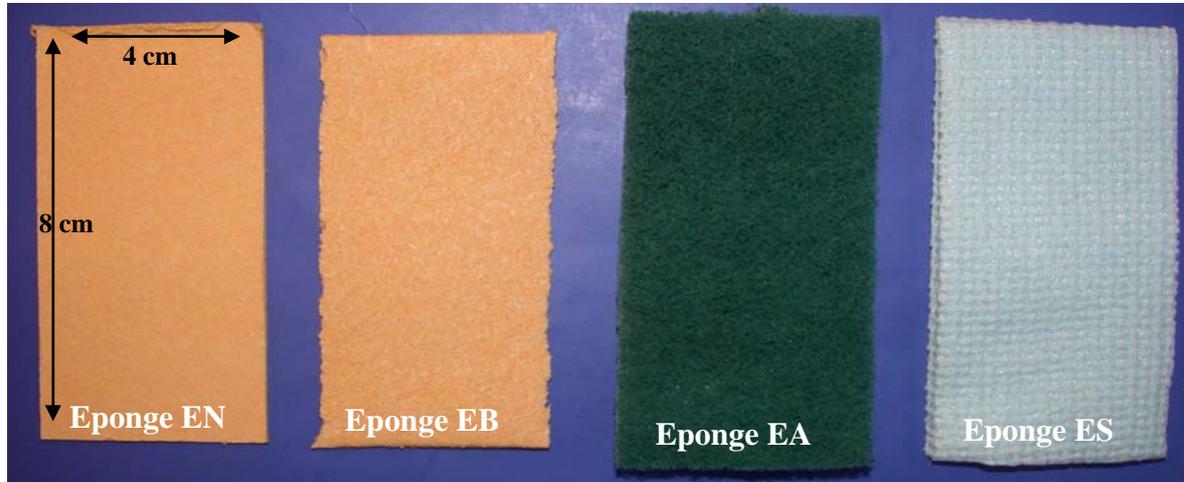


Photo 9 : Aperçu des cinq types d'éponge (l'éponge EAC, étant la combinaison de l'éponge EA et de la chiffonnette ES) utilisés pour les prélèvements par méthode non-destructive.

3.2.3 Schéma de prélèvement

Un même site de prélèvement a, à la fois, été échantillonné par excision puis par chiffonnage avec une des cinq éponges (double prélèvement). L'excision consistait à prélever, à l'aide d'un scalpel et d'un guide, 25 cm² du tissu superficiel des carcasses ou des quartiers avant sélectionnés. L'échantillon obtenu était ensuite placé dans un sac puis à 4°C. Pour la méthode non-destructive, la 1^{ère} étape consistait à humidifier l'éponge considérée avec 25ml de diluant en la massant de l'extérieur du sac. L'éponge était ensuite retirée stérilement du sac et appliquée dans la zone définie à l'aide du gabarit (10cm x 10cm). A noter que, pour chaque site de prélèvement, la zone échantillonnée par méthode non-destructive juxtaposait la zone prélevée par excision. L'éponge était ensuite « frottée » une dizaine de fois à la verticale et à l'horizontale puis replacée dans le sac à l'issue du chiffonnage. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C avant analyse au laboratoire. Quatorze prélèvements par type d'éponge (7 sur quartiers et 7 sur carcasses) ont été réalisés en parallèle de l'excision (Tableau XVI). Les échantillons Ex1 et C1 sont donc appariés puisqu'ils sont issus du même site de prélèvement alors que les échantillons Ex1 et Ex2 (ou C1 et C2), provenant de sites de prélèvement différents, sont indépendants (Tableau XVI).

Types d'éponges	Prélèvement par Excision	Prélèvement par Chiffonnage	Détail du site de prélèvement	
BIOTRACE	Ex1	C1	P	QA
	Ex2	C2	E	QA
	Ex3	C3	C	QA
	Ex4	C4	P	QA
	Ex5	C5	E	QA
	Ex6	C6	C	QA
	Ex7	C7	P	QA
	Ex8	C8	F	CC
	Ex9	C9	C	CC
	Ex10	C10	E	CC
	Ex11	C11	F	CC
	Ex12	C12	C	CC
	Ex13	C13	E	CC
	Ex14	C14	F	CC

P, Plat de côte ; E, Epaule ; C, Collier ; F, Flanc ; QA, Quartier Avant ; CC, Carcasse Chaude

Tableau XVI : Plan d'expérience réalisé pour évaluer les performances de l'éponge BIOTRACE par rapport à l'excision. Un plan d'expérience analogue a été effectué pour les 5 types d'éponge.

3.2.4 Analyses microbiologiques

Chacun des échantillons (tissus ou éponges) a ensuite été remis en suspension en ajoutant 50 ml de diluant dans les sacs avant d'être stomaché pendant 3 min. Les échantillons ont ensuite été dilués au 1/10^{ème} et au 1/100^{ème} avec du tryptone sel et chaque dilution a ensuite été utilisée pour le dénombrement de la flore totale à l'aide du TEMPO TVC (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Le niveau en flore totale de chaque échantillon (moyenne des 2 dilutions) a alors été déterminé à l'aide du TEMPO Reader (bioMérieux), après une incubation de 40h à 30°C.

3.2.5 Analyses statistiques

Pour chaque type d'éponge, les moyennes des niveaux en flore totale obtenus après excision et après chiffonnage ont été comparées en utilisant le test de Student avec séries appariées (un même site étant échantillonné à la fois par excision et par une des 5 éponges).

3.3 Résultats

Le tableau XVII présente le taux de récupération moyen obtenu pour les cinq types d'éponge et la moyenne des différences observées entre l'excision et chaque type d'éponge (Ex-Eg). La distribution des différences entre l'excision et le chiffonnage est également illustrée pour les 5 types d'éponge sur la figure 14.

Après comparaison des niveaux moyens récupérés par chaque technique, aucune différence significative ($P_{student} > 0.05$) n'a été observée entre l'excision et les éponges EN, EA et EB (Tableau XVII et Figure 14). Il est néanmoins important de souligner que, même s'il n'existe aucune différence significative, l'éponge EN (Nasco) présente des performances supérieures à celles de l'excision ($Ex-Eg = -0.14 \log_{10} UFC/cm^2$). Le niveau moyen de bactéries récupérées avec l'éponge EN ($2,53 \log_{10} UFC/cm^2$) est en effet supérieur à celui de l'excision ($2,39 \log_{10} UFC/cm^2$) (Tableau XVII et Figure 14).

L'éponge abrasive (EA), avec un taux de récupération voisin de celui de l'excision (excision, $2.95 \log_{10} UFC/cm^2$; chiffonnage EA, $2.84 \log_{10} UFC/cm^2$), présente les meilleures performances de récupération après l'éponge Nasco ($Ex-Eg = + 0.11 \log_{10} UFC/cm^2$) (Tableau XVII et Figure 14). Une différence légèrement plus élevée est par ailleurs observée entre l'excision et l'éponge EB ($Ex-Eg = + 0.15 \log_{10} UFC/cm^2$), avec des taux de récupération respectivement égaux à $2,6$ et $2,45 \log_{10} UFC/cm^2$.

Une différence significative ($P_{student} < 0.05$) a, en revanche, été mise en évidence entre l'excision et les éponges ES et EAC (double chiffonnage), traduisant ainsi un taux de récupération significativement inférieur de ces deux éponges par rapport à celui de l'excision ($Ex-Eg > + 0.4 \log_{10} UFC/cm^2$) (Tableau XVII et Figure 14).

Type d'éponge	n*	Taux de récupération	Ex-Eg	Intervalle de confiance [†]	P value [‡]
EN	14	2,53	-0,14	-0,45 , 0,17	0,34
EA	14	2,84	0,11	-0,32 , 0,55	0,6
EB	14	2,45	0,15	-0,28 , 0,6	0,45
ES	14	2,39	0,41	0,01 , 0,8	0,04
EAC	14	2,62	0,42	0,1 , 0,74	0,015

* Nombre de prélèvements effectués ; [†] Intervalle de confiance (95%) de Ex-Eg (Excision-Eponge) ; [‡] Valeur de P obtenue à l'issue du test de Student

Tableau XVII : Taux de récupération moyen ($\log_{10} UFC/cm^2$) obtenu pour les cinq types d'éponge et moyenne des différences observées entre l'excision et chaque type d'éponge (Ex-Eg). EN, Eponge Nasco ; EA, Eponge Abrasive ; EB, Eponge Biotrace ; ES, Chiffonnette SodiBox ; EAC, Eponge Abrasive + chiffonnette.

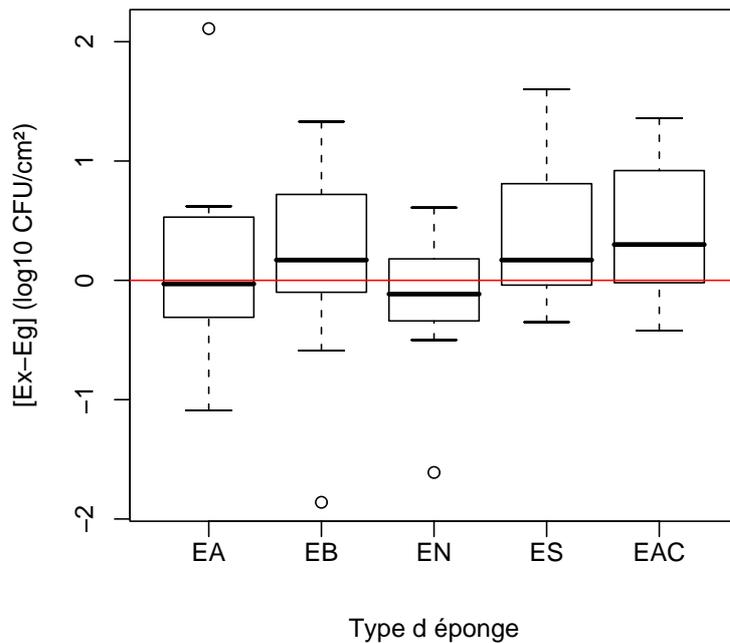


Figure 14 : Diagramme en boîte de la distribution des différences entre l'excision et le chiffonnage pour les 5 types d'éponge.

3.4 Discussion

Nos résultats montrent qu'il existe une différence significative entre les éponges ES (Chiffonnette) et EAC (Abrasif + chiffonnette) et la méthode de l'excision. Les performances de ces deux éponges, en terme de récupération des bactéries, sont significativement inférieures à celles de la méthode destructive. A l'inverse, l'éponge EN (Nasco) affiche des performances supérieures à celles de l'excision et l'éponge abrasive s'avère être la méthode non-destructive la plus efficace en terme de récupération après l'éponge Nasco. Néanmoins, les différences entre ces 2 éponges et l'excision sont non significatives. Pour ces 2 éponges, toutes les différences positives observées sont inférieures à 1 log et l'intervalle de confiance de la différence entre EX et EN est $[-0,45 ; 0,17]$, ce qui démontre que l'éponge Nasco ne conduit pas à une sous-estimation conséquente du niveau de contamination des carcasses.

Les résultats de cette étude sont partiellement en accord avec ceux reportés dans la littérature (Anderson et al., 1987 ; Gill et Jones, 2000). En effet, comme préalablement montré par ces auteurs, les matières abrasives (i.e. l'éponge EA dans notre étude), de part leurs propriétés, semblent améliorer la récupération des bactéries liées à la surface des carcasses par rapport aux éponges composées uniquement d'alginate ou de cellulose (i.e., l'éponge EB et la

chiffonnette ES). Toutefois, les résultats concernant l'éponge Nasco (composée d'alginate) vont à l'encontre de la précédente remarque puisque cette éponge affiche non seulement un taux de récupération supérieur à celui de l'éponge abrasive (EA) mais également supérieur à celui de la méthode destructive dite de référence, l'excision. A notre connaissance, aucune étude reportée dans la littérature n'évoque un taux de récupération supérieur d'une méthode non-destructive par rapport à celui de l'excision. Deux raisons peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. La première peut-être liée à une répartition hétérogène de la flore bactérienne, ce qui expliquerait, du fait de la surface échantillonnée plus importante, un taux de récupération supérieur de l'éponge Nasco. La seconde concerne la deuxième fonction d'une méthode de prélèvement, à savoir ses capacités de remise en suspension des bactéries (ou relargage dans le diluant). L'excision récupère manifestement toutes les bactéries présentes sur le tissu conjonctif prélevé, mais un stomachage insuffisant du tissu avec le diluant conduirait à une remise en suspension partielle des bactéries (les bactéries fortement liées au tissu n'étant pas décrochées), ce qui expliquerait, dans ce cas, ce taux de recouvrement inférieur à celui de l'éponge Nasco. En effet, les fabricants d'éponges travaillent certes sur les capacités de l'éponge à décrocher les bactéries de la surface des carcasses, mais également sur ses capacités à les relarguer dans le milieu. Cette dernière remarque pourrait ainsi expliquer les meilleures performances de l'éponge Nasco, qui est, aux Etats-Unis, l'éponge la plus utilisée pour la réalisation des prélèvements sur carcasses (communication personnelle, M. Koohmaraie).

Enfin, les faibles taux de récupération issus du double prélèvement (Abrasive + Chiffonnette) sur carcasses sont quelque peu surprenants, étant donné les performances élevées de l'éponge abrasive. La principale raison évoquée concernerait une remise en suspension insuffisante des bactéries dans le diluant après stomachage, du fait de la présence des 2 éponges dans un faible volume. A noter que la chiffonnette Sodibox (ES) a pour vocation première (indication fabricant) le prélèvement sur surfaces environnementales dont les caractéristiques semblent manifestement quelque peu éloignées de celles du tissu conjonctif des carcasses.

L'éponge Nasco et l'éponge abrasive qui affichent des taux de récupération semblables (voire supérieurs pour l'éponge Nasco) à l'excision pourraient ainsi être utilisées comme méthode non-destructive pour la recherche des STEC et de *E. coli* O157:H7 à la surface des carcasses de bovins. En effet, grâce à leur caractère non-destructif, ces deux méthodes permettent d'accroître la surface échantillonnée, ce qui a pour conséquence d'augmenter la probabilité de détecter les STEC sur la carcasse. En effet, pour des bactéries en faible nombre et, qui plus

est, réparties de manière non homogène sur la surface de la carcasse, l'accroissement de la surface échantillonnée permet manifestement un meilleur recouvrement (Gill et Jones (2000)).

Pour conclure, compte tenu de tous les éléments reportés dans cette étude et même s'il semble nécessaire de confirmer ces résultats en augmentant le nombre de prélèvements réalisés, une stratégie de prélèvement pour détecter les carcasses contaminées par les STEC peut être d'ores et déjà proposée.

Au moment de la pesée (voir ANNEXE VII), des lots de cinq carcasses pourraient être constitués tout au long de la journée d'abattage en vue d'un échantillonnage « groupé ». En effet, un prélèvement de 500 cm² pourrait être réalisé sur le flanc de chacune de ces cinq carcasses à l'aide d'une éponge (de type abrasive ou Nasco) humidifiée avec 25 ml de diluant. Les cinq éponges résultant de l'échantillonnage du lot précédemment constitué seraient ensuite poolées dans 300 ml de milieu d'enrichissement (type EPT) avant d'être enrichies 8h ou 24h à 41.5°C. La détection serait ensuite réalisée, après enrichissement sur une aliquote provenant de deux sacs de 300 ml correspondant à l'échantillonnage de deux lots (soit 10 carcasses de bovins). En cas de résultat positif de l'aliquote, un échantillonnage individuel des 10 carcasses devrait en conséquence être réalisé afin d'écarter la ou les carcasses réellement contaminées.

Ainsi, compte tenu des cadences d'abattage qui s'échelonnent de 30 à 60 bovins à l'heure sur une journée moyenne de 6 heures, le nombre de tests effectués par jour serait ainsi compris au minimum entre 18 et 36.

Cette stratégie d'échantillonnage mis en place *in fine* dans le but de maîtriser le « danger STEC » en aval lors de la production de steaks hachés reste donc néanmoins coûteuse en terme de temps et d'argent pour l'industriel. D'autre part, son application dans ce même cadre où l'abattoir est couplé à l'usine de production du haché s'avère quelque peu limitée, étant donné l'incorporation de viande foraine (i.e. carcasses ou quartiers avant exogènes à l'abattoir) dans la fabrication du steak haché.

Ainsi, une stratégie moins coûteuse devra être envisagée de façon à échantillonner l'ensemble de la matière première destinée à la fabrication de haché. Cette réflexion a été menée et est développée dans la partie « Discussion et Perspectives de recherche ». Elle concerne le prélèvement d'échantillons sur minerais juste avant le premier broyage (voir ANNEXE IX).

4. Conclusion

Les travaux de recherche, présentés ci-dessus au niveau du prélèvement sur carcasse et produit fini, devraient permettre aux industriels d'assurer une meilleure innocuité de leur produit. En effet, les protocoles proposés au niveau de l'abattoir (échantillonnage d'une plus grande surface des carcasses de bovins à l'aide de méthodes non-destructives) et des industries de transformation (prélèvement d'une prise d'essai plus importante) permettront de réduire à priori le risque de laisser passer *in fine* des lots de steaks hachés contaminés.



PUBLICATION N°5



**Optimization of the enrichment protocol for detection
of *Escherichia coli* O157 in ground beef by
the VIDAS *E. coli* O157 assay**

Running title: Optimization of the detection protocol of *E. coli* O157:H7

A. Vimont, C. Vernozy-Rozand, B. Mallen, C. Bavai, M. Dothal, A. Gleizal, N. Nguon
and M.-L. Delignette-Muller*

**Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de
Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France**

*Corresponding author. Phone: +33-4-78-87-25-50; fax: +33-4-78-87-25-54.

E-mail address: a.vimont@vet-lyon.fr

Abstract

The aim of this study was to optimize the current French testing protocol to detect *E. coli* O157:H7 in ground beef [ISO 16140] with a higher sample size and a reduced testing duration, while maintaining accuracy. The increase of the ground beef amount involves an increase of the “sample to broth” ratio which could have an effect on the *E. coli* O157:H7 detection. Thus, a one-step enrichment in Buffered Peptone Water (BPW) using three “sample to broth” ratios (25g:225ml [R1/10], 75g:175ml [R1/3], 125g:125ml [R1/2]) with a final volume in the stomacher bag of 250ml, were tested for the detection of artificially inoculated (5 CFU/bag) ground beef samples at two incubation temperatures (37°C and 41.5°C). In order to visualize the potential effect(s) of these enrichment factors, a modeling of the simultaneous growth of the background microflora (BM) and *E. coli* O157:H7 (O157) was carried out in parallel of a VIDAS Relative Fluorescence Value follow up. The present study shows that the optimal growth protocol for *E. coli* O157:H7 is a one-step enrichment at 41.5°C in BPW using either a R1/10 or R1/3 ratio. These last results and additional experiments allowed to suggest three protocols which consist in respectively enriching a 25g ground beef sample in 225ml of BPW during 8h (P.1), a 75g sample in 175ml of BPW during 18h (P.2) and a 375g sample in 750ml of BPW during 24h (P.3) at 41.5°C. These new protocols are less expensive and time consuming than the current one, and enhance (for P.2 and P.3) the probability to detect *E. coli* O157:H7 from ground beef.

Keywords: ground beef, E. coli O157, enrichment protocol, detection method, VIDAS

1. Introduction

Escherichia coli O157:H7 is an emerging cause of food-borne illness and has become a public health priority (Catarama et al., 2003). In human infections, *E. coli* O157:H7 may cause bloody diarrhea, and more precisely may lead to Hemolytic-Uremic Syndrome (HUS) and to Thrombotic and Thrombocytopenic Purpura (TTP) for children and adults, respectively (Tarr, 1995; Griffin and Tauxe, 1991). Illness is often linked to the consumption of contaminated or undercooked ground beef (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Centers for Disease Control and Prevention, 1997; Bell et al., 1994; Orr et al., 1994). For instance in France, 70 persons were recently infected by *E. coli* O157:H7 after consumption of ground beef; 29 of them contracted bloody diarrhea and 17 cases of HUS were also reported. Because there is no microbiological criteria for *E. coli* O157:H7 in foodstuffs, meat industries do not systematically detect this food-borne pathogen from ground beef or use protocols that take into account their own industrial requirements (i.e. short testing duration, low cost...) with no scientific validation. Protocols vary in sampling procedures, the amount of meat tested, and the detection test used. With the view to ensure a greater safety and quality of ground beef products, there is a need for evaluating and comparing rapid, simple and inexpensive sampling and testing protocols to improve *E. coli* O157:H7 detection while taking into account the industry work flow and its economic constraints.

Currently, the French validated method [ISO 16140] for detecting *E. coli* O157:H7 in ground beef requires a sample size of 25g successively enriched in two selective broths incubated at two different temperatures (respectively at 42°C and 37°C), with a total enrichment duration of 30 hours before screening by the VIDAS *E. coli* O157 [ECO] assay (bioMérieux). The main objective of this study, which is part of a global research program whose purpose is to propose simple and reliable sampling and testing protocols suitable for meat industries, is to improve from an analytical point of view this protocol [ISO 16140]. Indeed the risk of selling contaminated meat could be limited by increasing the number of tests performed on each ground beef batch leading to high testing costs. An alternative solution could be obtained by pooling different samples in one composite sample or by increasing the size of each ground beef sample taken. The increase of the sample size involves the increase of the “sample to broth” ratio when using stomacher bags with constant final volume (250ml). This modified ratio could have an impact on the growth of *E. coli* O157:H7 leading to false negative result and therefore different ratios should be tested.

In addition to allow more flexibility in case of one batch contamination and because ground beef is a highly perishable product, the duration of the testing protocol should be reduced. For that purpose, the validated method should be simplified by using only one basal medium and its performance must be improved by providing to *E. coli* O157:H7 an optimal growth environment. Hence, we decided to test an incubation temperature of 41.5°C, which could be at the same time an optimal growth temperature for *E. coli* O157:H7 (**Gonthier et al., 2001; Nauta and Dufrenne, 1999**) and a good selective factor for background microflora.

Thus in this study, a one-step enrichment in Buffered Peptone Water (BPW) using three “sample to broth” ratios (25g:225ml [R1/10], 75g:175ml [R1/3], 125g:125ml [R1/2]) with a final volume in the stomacher bag of 250ml, two incubation temperatures (37°C and 41.5°C) were tested with a constant inoculation level (~5 CFU per bag). In order to visualize the potential effects of these enrichment factors and thus to determine the optimal growth conditions for *E. coli* O157:H7, a growth follow-up was firstly carried out in parallel of a RFV (Relative Fluorescence Value obtained after screening by the VIDAS ECO) follow up; secondly a modeling of the simultaneous growth of background microflora and *E. coli* O157:H7 was performed.

2. Materials and methods

2.1. Inoculum preparation

The three strains used in the present study were isolated (during previous epidemiological studies) from human faeces (Strain 1), slaughter environment (Strain 2), ground beef (Strain 3) and stored at -80°C in a glycerol-containing medium. Prior to challenge testing each strain was grown in brain heart infusion (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) at 37°C in order to obtain late-exponential-phase cultures. After 24h incubation, the density of each culture was adjusted to 0.8 MacFarland ($\sim 10^8$ CFU ml⁻¹), and these precultures were then used for inoculation of ground beef samples.

2.2. Microbiological culture media and screening method

In different stages of the study, various microbiological culture media were used. Tryptone Medium (Fluka-Biochemika, Switzerland) was used for preparation of serial dilutions throughout the experiment. Buffer Peptone Water [BPW] (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) was used as enrichment broth before screening by the VIDAS *E. coli* O157 [ECO] assay (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The VIDAS ECO assay is an Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay [ELFA] for the detection of *E. coli* O157 antigens using the automated VIDAS instrument. When the VIDAS *E. coli* O157 Assay was completed, the results were analyzed by the instrument and a Relative Fluorescence Value (RFV) is generated and printed for each sample. The theoretical RFV cut-off value is always fixed about at 415 by the manufacturer. Indeed a result with a RFV that is greater than (or equal to) the cut-off value cited above indicates a positive sample, and vice versa. Finally, Plate Count Agar [PCA] (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and O157:H7 ID supplemented with Cefixime-Tellurite mixture (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) [CT-O157:H7 ID] were used as a non selective medium for the enumeration of the ground beef background microflora (BM), and as a selective medium for the enumeration and isolation of *E. coli* O157:H7 (O157) during the enrichment step, respectively.

2.3. Ground beef sample inoculation and enrichment protocols

The experiment described below was carried out in triplicate at 3 different dates. For each date of experiment, two packages containing each one 800g of ground beef (15% fat and non vacuum and non modified atmosphere packed) were purchased from a supermarket in the

suburbs of Lyon (France). Prior to the beginning of experiment, the absence of O157 antigen in all portions of ground beef was confirmed. Then, all ground beef portions (a whole of 1600g per experiment) were mixed together and six 25g samples, six 75g samples and six 125g samples were aseptically weighed into 18 different stomacher bags. The precultures of the three *E. coli* O157:H7 strains were serially diluted in order to obtain a final concentration of ~ 5 CFU ml⁻¹ in fresh tryptone medium. Then for each *E. coli* O157:H7 strain, six bags (2x25g, 2x75g, 2x125g) were individually inoculated with 1 ml of the bacterial suspension. After manual homogenization, the 18 bags (6 bags for each strain) were stored overnight at 4°C. Next day, the 18 samples obtained at the end of the ground beef sample inoculation were stomached for 1 min with their respective volume of BPW (Table 1), and left at ambient temperature for a 40 min regeneration step before the incubation period. The final concentration obtained in each stomacher bag (regardless of the ground beef sample size tested) was roughly 0.02 CFU of O157 ml⁻¹. Growth experiments were carried out with the three O157 strains in the presence of BM for the six enrichment protocols, which were the result of the combination of two temperatures (37 or 41.5°C) and three “sample to broth” ratios (R1/10, R1/3, R1/2) (Table 1).

2.4. Growth and RFV monitoring.

At each sampling time (every 2 h from 0 to 14h and at 24h), the numbers of viable cells of BM and O157 were determined for each enrichment protocol by plating aliquots of appropriate dilutions of samples onto PCA and CT-O157:H7 ID, respectively. After incubation, the colonies on PCA and CT-O157:H7 ID plates were counted in order to obtain BM and O157 growth data for each protocol. Moreover a RFV follow up was carried out from 6 to 14h for each protocol by screening an aliquot of each bag every 2 hours with the VIDAS ECO assay.

2.5. Growth modeling

2.5.1. Modeling of individual BM and O157 growth kinetics

Two growth models were used to separately fit individually observed BM and O157 growth kinetics for all the protocols tested. The first model, which has three parameters, is a very simple model with two phases (**Baty, Flandrois, & Delignette-Muller, 2002**) (model 1). It describes only the exponential and the stationary phases and does not take into account any lag phase:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t & \text{if } t < t_{\max} \\ y_0 + \frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \times t_{\max} & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (1)$$

where $y(t)$ is the bacterial density (in $\log_{10}(\text{CFU ml}^{-1})$) at time t (in h), y_0 is the initial bacterial density (in $\log_{10}(\text{CFU ml}^{-1})$), μ_{\max} is the maximum specific growth rate (in h^{-1}), and t_{\max} is the time at which the stationary phase begins (i.e., the time at which the maximum bacterial density is reached).

The second model, which has four parameters, incorporates a third phase, the lag phase (λ) (in h) (model 2). Curves described by this model show an abrupt transition (breakpoint) between the lag and the exponential phases:

$$y(t) = \begin{cases} y_0 & \text{if } t < \lambda \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t - \lambda) & \text{if } \lambda \leq t < t_{\max} \\ y_0 + \left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(10)} \right) \times (t_{\max} - \lambda) & \text{if } t \geq t_{\max} \end{cases} \quad (2)$$

2.5.2. Global modeling of simultaneous growth of BM and O157

A global model (model 3) for the simultaneous growth of BM and O157 is simply defined as using model 1 (without lag phase) for O157 flora along with model 2 (with lag phase) for the background flora. Model 3 is defined by seven parameters (y_{0O157} , $\mu_{\max O157}$, $t_{\max O157}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, $t_{\max BM}$) which may be estimated by two individual fittings of model 1 and model 2 on O157 and BM growth kinetics, or by a global fitting of model 3. A partial model nested in model 3 is also defined in the same way, but assuming a common value of t_{\max} for the two floras (model 4). This last model has thus only six parameters (y_{0O157} , $\mu_{\max O157}$, y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$, t_{\max}) and is based on the hypothesis that there is a competition between the two floras studied. More precisely, in model 4 the growth of each microflora is assumed to stop as soon as one microflora reaches its maximum density in the enrichment basal medium. This phenomenon has been described previously and is commonly called the Jameson effect (Cornu, Kalmokoff, & Flandrois, 2002; Gimenez and Dalgaard, 2004; Malakar et al., 1999; Breidt and Fleming, 1998; Pin and Baranyi, 1998; Carlin, Nguyen-The, & Morris, 1996).

2.6. Statistical methods

Fitting of models to the BM and O157 data was performed by nonlinear regression by using the least-squares criterion. Estimates for parameters were obtained by minimizing the residual sum of squares (RSS):

$$RSS = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3)$$

where N is the number of data points, y_i is the observed data value, and \hat{y}_i is the fitted value. Nonlinear regression was computed with the `NonlinearLeastSquares` function of R-Software. An analysis of variance (ANOVA) was carried out in order to compare for the different enrichment protocols tested, the mean O157 growth parameters (y_{0O157} , $\mu_{\max O157}$), the mean BM growth parameters (y_{0BM} , λ_{BM} , $\mu_{\max BM}$) and the mean RFV obtained at 6, 8 and 10h. For each of these 8 variables, a mixed ANOVA model was considered, in which the “sample to broth” ratio and the temperature were considered as fixed factors, and the date of experiment and the strain were considered as random factors. The only interaction considered in the model was the one between the two fixed factors.

3. Results

3.1. Global fits of simultaneous growth of BM and O157

It is worth noting that experimental points were missing at the beginning of the O157 growth kinetics for each experiment and each enrichment protocol tested, because of experimental limits (i.e., the O157 inoculum tested was very low (Table 2) and no bacteria could be counted sometimes for the first sampling times because of plating threshold of detection). For the fitting of growth data, the first missing point at $t=0$ was replaced by the O157 experimental inoculum measured for each experiment (Table 2).

The O157 growth kinetics seem to be generally characterized by only two phases; an exponential phase followed by a stationary phase (Fig. 1). Thus, for each enrichment model 1 was used to fit the data obtained for the three *E. coli* O157:H7 strains. For the background microflora growth, a similar growth kinetic was obtained with all the enrichment protocols tested. It is characterized by three phases, i.e., a lag phase followed by an exponential and a stationary phase. Hence, the best fit of the BM growth data was obtained by model 2. Furthermore, the simultaneous growth kinetics of the three *E. coli* O157:H7 strains and the

background microflora obtained for the six protocols (tested in triplicate) highlighted that the parameters $t_{\max O157}$ and $t_{\max BM}$ seemed to be very similar. This could be observed for instance for growth kinetics of Strain 2 and BM on Figure 1. The approach developed in **Vimont et al. (2006)** was used to show, by comparing models 3 and 4 on the data, that it was reasonable to assume a common t_{\max} for the two microflora (results not shown). Figure 1 shows for Strain 2 that growth data were well described by model 4, which is based on the hypothesis that there is a simple competition between the BM and O157 microfloras, indeed O157 growth stopped as soon as BM growth reached the maximal level. The same results were observed for Strain 1 and Strain 3 except than two data sets (S3.R1/10.37 and S1.R1/2.37 of experiments I and II, respectively) were removed from the study because experimental points were missing for technical reasons.

It must be emphasized that the BM initial level (y_{0BM}) was different between the three dates of experiment and obviously between the three ratio tested (Table 2). Moreover, the maximal level for O157 varies (from 3.31 to 6.58 \log_{10} CFU ml^{-1}) according to the protocol tested, and decreases as the “sample to broth” ratio increases (Fig. 1).

3.2. Impact of enrichment factors on BM and O157 growth parameters

The p values characterizing the effects of the Temperature and Ratio fixed factors and their interaction (R:T), and the effects of the Strain and Experiment random factors on the 8 variables studied, are displayed in Table 3. Furthermore, the interaction plots of the mean of growth parameters of model 4 and of the RFV values for each ratio and each temperature obtained with the ANOVA are shown on Figure 2. It is worth noting that the initial level of O157 (y_{0O157}) is significantly different between the three dates of experiment, but not between the two temperatures and the three ratios tested (Fig. 2a, Table 3). As shown in Figure 2b, the “sample to broth” ratio and the temperature also have a significant effect on the mean O157 specific growth rate value ($\mu_{\max O157}$), but with a significant interaction between these two factors (Table 3). The increase of the ratio tends to decrease $\mu_{\max O157}$ but more strongly at 41.5°C. At the ratio R1/10, $\mu_{\max O157}$ is higher at 41.5°C but it is less pronounced for the other ratios (Fig. 2b).

Concerning the background microflora, as obviously expected, its initial mean level (y_{0BM}) increases significantly as the “sample to broth” ratio increases and an effect of the date of experiment is also pointed out (Fig. 2c, Table 3). Figure 2d displays that the mean BM lag time value (λ_{BM}) increases significantly as the “sample to broth” ratio increases for both temperatures, with higher values at 41.5°C (Table 3). The “sample to broth” ratio and the temperature effects on the mean BM specific growth rate value ($\mu_{\max BM}$) are the same ones as those observed on $\mu_{\max O157}$ (Fig. 2e).

Finally, it must be emphasized that the date of experiment has a significant effect on the $\mu_{\max O157}$, λ_{BM} and $\mu_{\max BM}$ (Table 3).

3.3. Impact of enrichment factors on the RFV (6, 8, 10h)

The three O157 strains RFV kinetics for the six protocols tested in triplicate are displayed on Figure 3. Regardless of the “sample to broth” ratio and temperature tested, 3 out of the 54 samples tested are positive after 6 hours of incubation by the VIDAS ECO assay and 39 (72%) are positive after 8 hours of incubation (Figure 3). The number of samples positive after 8 hours is significantly greater at 41.5°C incubation than at 37°C ($P < 0.001$, as determined by *khi2* test). At 41.5°C, all the samples are positive for the ratios R1/10 and R1/3 (i.e., 25g:225ml and 75g:175ml) but only 89% are positive for the ratio R1/2 (i.e., 125g:125ml) (Figure 3). For the ratio R1/2, the samples are all positive only after 10 hours incubation at 41.5°C whereas some samples are just positive after 14 hours incubation at 37°C.

The analysis of variance highlighted a significant effect of the temperature and the ratio on the mean RFV6h, RFV8h and RFV10h. The RFV increases significantly when the “sample to broth” ratio decreases for both temperatures and is higher at 41.5°C (even if the one first-order interaction between these two fixed factors has a significant effect on RFV6h (Fig 2f, 2g, 2h, Table 3). Finally, it must be emphasized firstly that the date of experiment has a significant effect on the RFV values (6h, 8h and 10h) and secondly that there is no significant strain effect on RFV values (Table 3).

4. Discussion

The increase of the sample size tested allows to enhance the probability to detect contaminated batches. More precisely, for a low contamination level of 1 CFU/25g, this probability is respectively equal to 63% and 95% (according to the *Poisson distribution*) for one sample size of 25g and 75g. Nevertheless, this increase of the ground beef amount involves obviously an increase of the “sample to broth” ratio, when stomacher bags with constant final volume are used. Thus, the relevance of our experiments was to study the effect of different ratios on the *E. coli* O157:H7 detection by the VIDAS ECO in order to suggest protocols which could improve the probability to detect (with shorter testing duration) *E. coli* O157 from ground beef while maintaining accuracy.

Our results indicate that there was a simple competitive interaction between *E. coli* O157:H7 and the prevailing background microflora during the enrichment step for ground beef. In fact, O157 growth stopped as soon as the level of BM reached the maximal value, which was almost constant regardless of the enrichment protocol considered. Our model was limited because it did not address other types of interactions which may take place during enrichment, but it seemed to be sufficient to describe the simultaneous growth of the two floras based on the observed data.

With the view of reducing the duration of testing protocols while improving their probability of detection by increasing sample size, the present study shows that the R1/2 (125g:125ml) ratio is not an optimal ratio for the growth of *E. coli* O157:H7, especially for an incubation temperature of 37°C. The optimal growth protocol for *E. coli* O157:H7 identified in our experiments is a one-step enrichment at 41.5°C in buffered peptone water using either a R1/10 or R1/3 “sample to broth” ratio with a final volume in the stomacher bag of 250 ml. Indeed for these optimal growth conditions found, the $\mu_{\max O157}$ value is higher than for the other conditions tested, what explains a faster detection of *E. coli* O157 by the VIDAS ECO assay. The use of a R1/3 ratio was also recently reported by **Guerini et al. (2006)** who pointed that a R1/3 ratio worked as well as a R1/10 ratio. The growth of O157 was better at 41.5°C than at 37°C, and the use of this optimal incubation temperature, which was previously (**Gonthier et al., 2001**) highlighted as a preferred incubation temperature for *E. coli* O157:H7, allows to detect the pathogen after only 8 hours incubation while increasing the sample size until a 75g:175ml ratio. Finally, the use of only one non selective broth (BPW) instead of two selective broths is in agreement with **Asakura et al. (1998)** who pointed out that enrichment broths without selective ingredients were more effective than those in which

selective ingredients were added. Furthermore, Vimont et al. (2007) showed that the addition of novobiocin into enrichment broths could lead to false negative results.

With these last results and in order to come up to the industry expectations and to avoid outbreaks caused by *E. coli* O157:H7 in future, two protocols could be proposed. The first and second protocols consist in enriching a 25g and a 75g ground beef sample in 225 ml and 175 ml of BPW during 8 h at 41.5°C, respectively. However, some *E. coli* O157:H7 strains could be stressed in ground beef samples screened, because of raw frozen trim added sometimes in ground beef batch production. Thus, the two protocols suggested above were tested by using ground beef samples artificially inoculated with one of the three O157 strains (from ~1 to 5 CFU/bag) and frozen 6 days at -40°C. The eight replicates carried out per strain for each protocol showed that after 8 h all 25g samples were positive whereas 21% of the 75g samples were still not detected by the VIDAS ECO assay after 8 hours incubation at 41.5°C, and all of them were positive only after 18 hours incubation. This last experiment pointed out the inadequacy of 8 hours incubation for the enrichment of 75g ground beef sample in 175ml of BPW at 41.5°C. Indeed, freezing involved a lag phase to the O157 cells (**Whiting and Bagi, 2002**), what could explain the lack of incubation duration for the second protocol for which $\mu_{\max O157}$ mean value is lower than that one observed for the first protocol (i.e. 25g:225ml). Hence the first protocol growth conditions remain unchanged, but the incubation period should be increased to 16-18h (overnight) for the second one in order to reliably detect *E. coli* O157:H7 in 75g ground beef sample.

The increase in sample size tested (i.e. 75g instead of 25g) allows to improve the probability to detect a contaminated grinder batch from 63% to 95% for a contamination level (1 CFU/25g). Nevertheless for a lower contamination level (0.1 CFU/25g), this probability decreases and is equal to 10% and 26% for one sample size of 25 and 75g, respectively. The probability may still be improved by using larger stomacher bags which allow to increase the sample size tested. It is then equal to 80% for one sample size of 375g. Thus, in a second experiment 375g ground beef samples were artificially inoculated with one of the three O157 strains (from 1 to 5 CFU/bag) and then frozen 6 days at -40°C. Four 375g samples per strain were then enriched at 41.5°C in 750ml of BPW before screening by the VIDAS ECO assay. Indeed, thanks to the R1/3 ratio effectiveness previously highlighted, the volume of BPW could be decreased from 3375ml to 750ml, thus saving reagents. At 8 hours, none of the samples was positive and a 24h incubation was required to detect 100% of the 375g samples tested.

It is worth recalling that the two first protocols proposed (25g in 225ml and 75g in 175ml of BPW) did not require a resizing of the laboratory equipment (stomacher bag, stomacher, incubator...) whereas the third one suggested (375g in 750ml of BPW) required larger stomacher bags (at least 2 liters) and laboratory equipment adapted. These three protocols had several advantages compared to the protocol currently used [ISO 16140]. Indeed for the new protocols, the enrichment is made with only one inexpensive basal medium (BPW) at 41.5°C compared to the use of two more expensive selective broths at two different incubation temperatures (37 and 42°C) for the current protocol [ISO 16140]. Thanks to the use of only one basal medium and incubation temperature, the experiment duration and cost are thus reduced, even if for the third protocol the volume of broth used is higher than the one used currently (225 ml). Furthermore, the testing total duration decreased from 30 h to 8 h for the first protocol (25g in 225ml of BPW), to 16-18 h for the second one (75g in 175ml of BPW), and to 24 h for the third one (375g in 750ml of BPW). The reduction of the testing duration allows a simplification of the work flow and also a reduction of the storage costs, for the manufacturer. Finally, the second and third protocols with a higher sample size allow to enhance the probability to detect *E. coli* O157:H7 in ground beef batches.

In conclusion this study pointed out that, in order to improve O157 detection probability, the “sample to broth” ratio could be increased from R1/10 (i.e., 25g:225ml) to R1/3 (i.e., 75g:175ml or 375g:750ml) while maintaining accuracy and suggests thus new protocols which could limit the risk of distributing contaminated batches while taking into account the industry work flow and its economic constraints.

Acknowledgments

We thank, Mrs. Ammara Beddiaf for a part of the preparation of the experiment. This work was supported by the French Food Safety Agency (AFSSA; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France).

References

- Asakura, H., Makino, S., Shirahata, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., Ikeda, T., & Takeshi, K. (1998). Detection and long-term existence of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* in sheep. *Microbiology and Immunology*, *66*, 683-688.
- Baty, F., Flandrois, J. P., & Delignette-Muller, M. L. (2002). Modeling the Lag Time of *Listeria monocytogenes* from Viable Count Enumeration and Optical Density Data. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 5816-5825.
- 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. (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and haemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *The Journal of American Medical Association*, *272*, 1349-1353.
- Breidt, F., & Fleming, H. P. (1998). Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3159-3165.
- Carlin, F., Nguyen-The, C., Morris, C. E. (1996). Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Journal of Food Protection*, *59*, 698-703.
- Catarama, T. M. G., O'Hanlon, K. A., Duffy, G., Sheridan, J. J., Blair, I. S. & McDowell, D. A. (2003). Optimisation of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *Journal of Applied Microbiology*, *95*, 949-957.
- Centers for Disease Control and Prevention. (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.
- Centers for Disease Control and Prevention. (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.
- Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, *73*, 261-274.

- Gimenez, B., & Dalgaard, P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 96-109.
- Gonthier, A., Guérin-Faubleé, V., Tilly, B., & Delignette-Muller, M. L. (2001). Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 352-356.
- Griffin, P., & Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13, 60-98.
- Guerini, M. N., Arthur, T. M., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (2006). Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. *Journal of Food Protection*, 69, 1007-1011
- Malakar P. K., Martens, D. E., Zwietering, M. H., Beal, C. & Van 't Riet, K. (1999). Modeling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*. II. Mixed cultures and shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 67-79.
- Nauta, M. J., & Dufrenne, J. (1999). Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quantitative Microbiology*, 1, 137-155.
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., & MacDonald, S. (1994). An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. The Journal of Infectious Diseases*, 26, 675-684.
- Pin, C., & Baranyi, J. (1998). Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 59-72.
- Tarr, P. (1995). *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 20, 1-8.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Lazizzera, C., Bavai, C., & Delignette-Muller, M. L. (2006). Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 261-268.
- Whiting, R. C., & Bagi, L. K. (2002). Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 291-295.

Figure captions

Fig. 1. Simultaneous growth kinetics of *E. coli* O157:H7 Strain 2 and background microflora (BM) obtained for the six protocols tested in triplicate, (the first column corresponds to Experiment I; the second one to Experiment II and the third one to Experiment III) and theoretical curves obtained by fitting of model 4. Gray symbols and curves show the data for the BM, and black symbols and curves show the data for O157.

Fig. 2. Interaction plots of the mean of growth parameters of model 4 and of the RFV values obtained at 6, 8 and 10h for each ratio and each temperature (37°C : dotted lines; 41.5°C : solid lines). (a) y_{0O157} ; (b) $\mu_{\max O157}$; (c) y_{0BM} ; (d) λ_{BM} ; (e) $\mu_{\max BM}$; (f) RFV_{6h}; (g) RFV_{8h}; (h) RFV_{10h}. More precisely, the values displayed on the graph for each variable and each protocol studied correspond to mean values of the three experiments and the three O157 strains tested. The ratios R1/10, R1/3 and R1/2 correspond respectively to the “sample to broth” ratios 25g:225ml, 75g:175ml and 125g:125ml.

Fig. 3. RFV kinetics of the three O157 strains for the six protocols tested in triplicate. ●, Strain 1; +, Strain 2, o, Strain 3. Black solid lines, gray solid lines and black dotted lines represent respectively data obtained for Experiment I, II and III. The VIDAS ECO RFV cut-off value is represented by a horizontal dotted line.

Fig. 1.

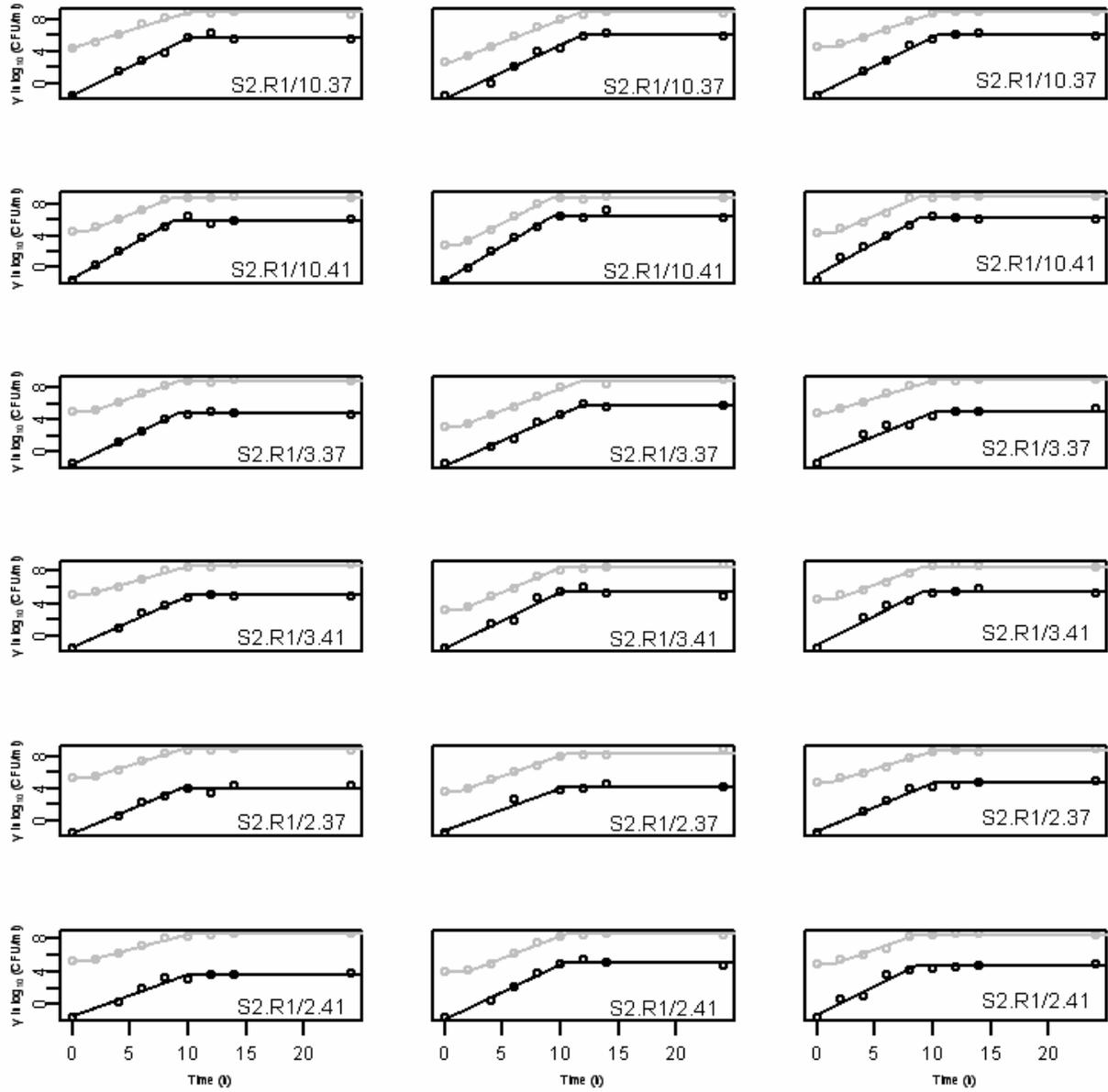


Fig. 2.

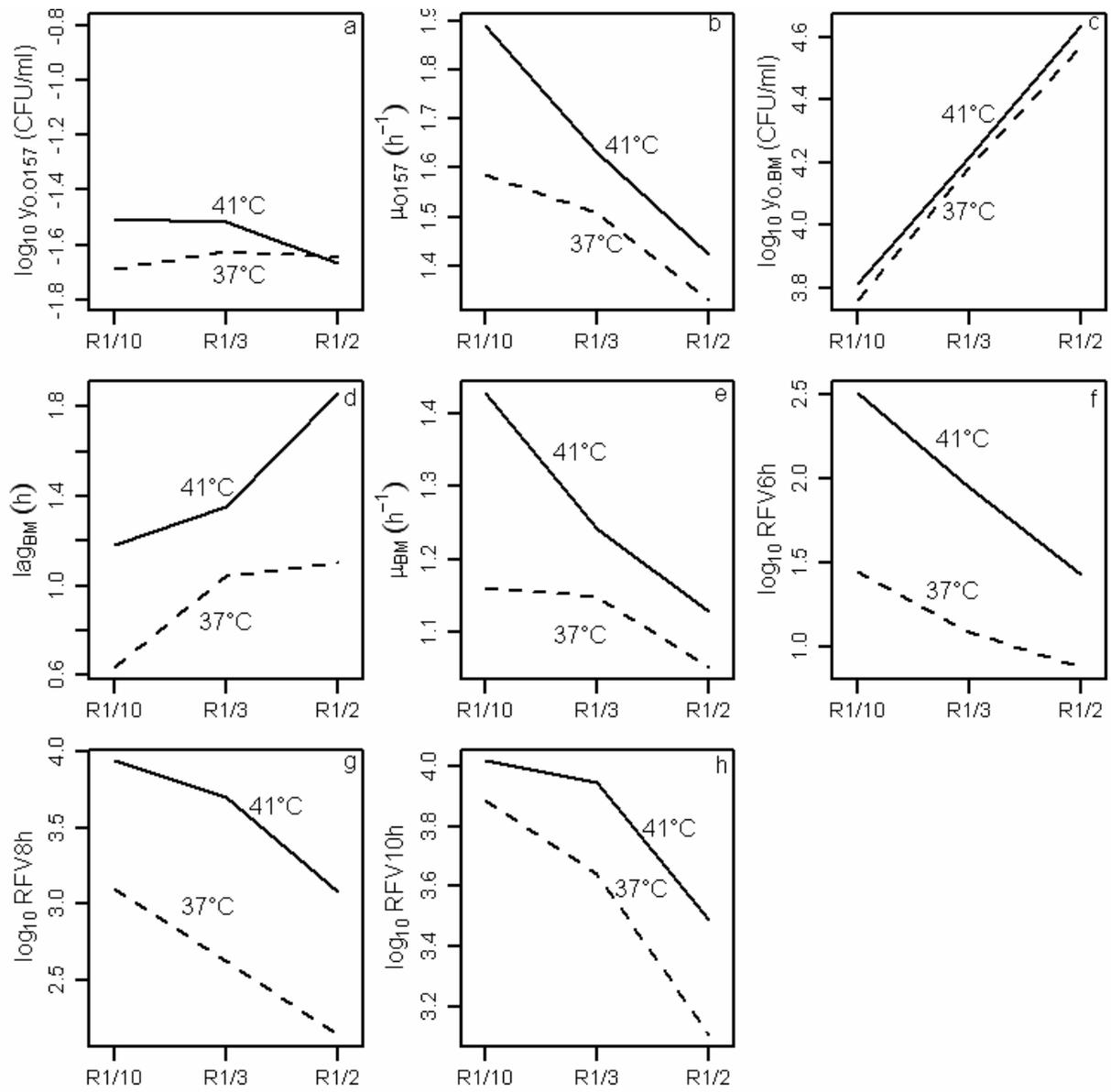


Fig. 3.

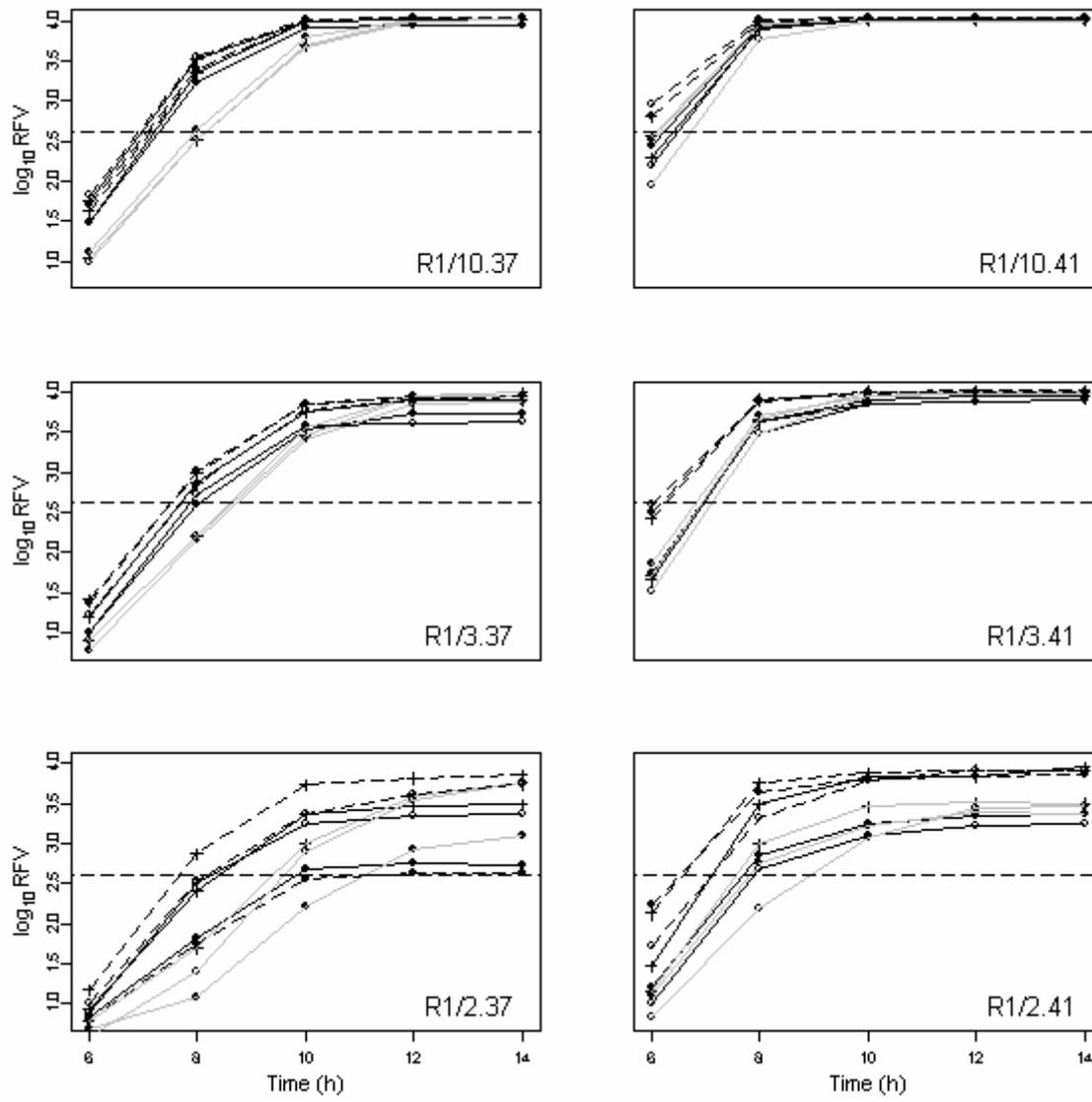


Table 1. Enrichment protocols tested for each strain (3 replicates)

Strain	“sample to broth ^a ” Ratio	Temperature (°C) ^b	Code
Strain 1	R1/10 (25g:225ml)	37	S1.R1/10.37
		41.5	S1.R1/10.41
	R1/3 (75g:175ml)	37	S1.R1/3.37
		41.5	S1.R1/3.41
	R1/2 (125g:125ml)	37	S1.R1/2.37
		41.5	S1.R1/2.41
Strain 2	R1/10 (25g:225ml)	37	S2.R1/10.37
		41.5	S2.R1/10.41
	R1/3 (75g:175ml)	37	S2.R1/3.37
		41.5	S2.R1/3.41
	R1/2 (125g:125ml)	37	S2.R1/2.37
		41.5	S2.R1/2.41
Strain 3	R1/10 (25g:225ml)	37	S3.R1/10.37
		41.5	S3.R1/10.41
	R1/3 (75g:175ml)	37	S3.R1/3.37
		41.5	S3.R1/3.41
	R1/2 (125g:125ml)	37	S3.R1/2.37
		41.5	S3.R1/2.41

^a Buffer Peptone Water (BPW)

^b The samples were incubated at 37 or 41.5°C

Table 2. Experimental initial levels of BM and O157 obtained for each date of experiment

Experiment/Flora	Strain 1	Strain 2	Strain 3	BM (R1/10)	BM (R1/3)	BM (R1/2)
Experiment I ^a	18 ^b	7	7	4.4 ^c	4.9	5.2
Experiment II	10	10	8	2.9	3.3	3.9
Experiment III	4	1	5	4.1	4.4	4.6

^a Date of experiment (I, II, III).

^b Average of O157 initial level (CFU/250ml) for Strain 1, Strain 2, Strain 3 inoculated in each bag (regardless of the “sample to broth” ratio and temperature tested).

^c Average of y_{0BM} (\log_{10} CFU ml⁻¹ in bag) obtained for the 3 “sample to broth” ratios (R1/10, R1/3, R1/2) tested (regardless of the temperature studied).

Table 3. *P* values (obtained with the ANOVA) characterizing the effects of the Temperature and Ratio fixed factors and their interaction (R:T), and the effects of the Strain and Experiment random factors on the 8 variables studied.

Variables/Factors	Temperature	Ratio	Strain	Experiment	Interaction (R :T)
$y_{0.0157}$	0.148	0.377	0.430	0.0008***	0.202
μ_{0157}	1.1E-05***	4.7E-11***	0.04*	0.0001***	0.02*
$y_{0.BM}$	0.79	0.0007***	0.74	0.044*	0.93
λ_{BM}	3.08E-05***	0.0002***	0.85	0.02*	0.5
μ_{BM}	0.0004***	4.7E-05***	0.83	2.3E-05***	0.03*
RFV _{8h}	2.6E-12***	3.5E-09***	0.64	0.02*	0.78
RFV _{6h}	4.3E-14***	2E-11***	0.24	5.3E-06***	0.005**
RFV _{10h}	0.0001***	1.8E-10***	0.61	0.02*	0.13

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$

Introduction

Escherichia coli O157:H7 (E157) is known to cause severe illness in humans (i.e. Hemolytic-Uremic Syndrome [HUS] and Thrombotic and Thrombocytopenic Purpura [TTP]) and has become a public health priority. In France, 70 persons were recently infected by *E. coli* O157:H7 after consumption of ground beef, 29 of them contracted bloody diarrhea and 17 cases of HUS were also reported. Paradoxically, there is no European microbiological criteria for *E. coli* O157:H7 in foodstuffs. Hence, meat industries do not systematically test for this food-borne pathogen from ground beef for many use protocols that take into account their own industrial requirements (i.e. shortest lag duration, sample pooling, rapid test methods...).

There is a need for evaluating and comparing rapid, simple and inexpensive sampling and testing protocols to improve *E. coli* O157:H7 detection while taking into account the industry work flow and its economic constraints.

Objective
 Provide a specific cost effective and optimal enrichment protocol for the rapid and accurate detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef, using the ISO 16140 validated VIDAS ECO test (bioMérieux)

Materials and Methods

Fig.1 Ground beef sample (15% fat) inoculation and enrichment protocols

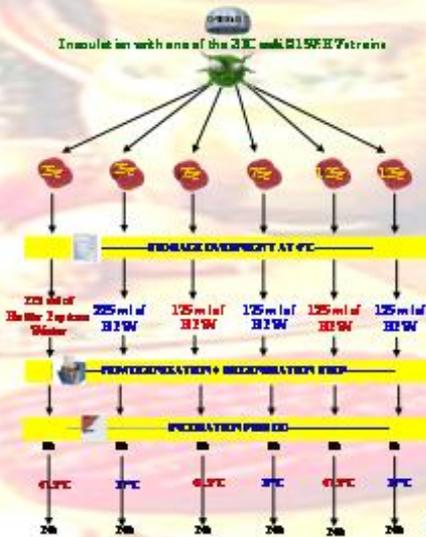


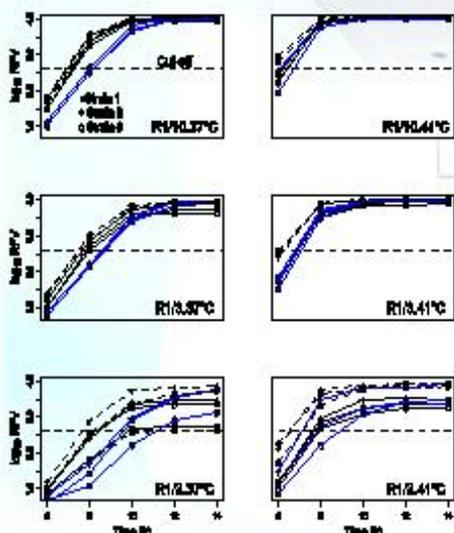
Table. 1 Experimental initial levels of Background Microflora [BM] and *E. coli* O157:H7 obtained for set of experiment

Experimentation	Strain 1	Strain 2	Strain 3	BM (R1/10) ^a	BM (R1/3) ^a	BM (R1/2) ^a
Experiment I	10 ⁶	7	7	4.4	4.9	3.3
Experiment II	10	10	8	3.9	3.3	1.9
Experiment III	4	1	3	4.1	4.4	4.1

^a Average of O157 initial level (CFU/250ml) inoculated in each bag
^b Average of (log10 CFU/ml) in bag) obtained for the 3 "sample to broth" ratios
^c "Sample to broth" ratios: R1/10, 25g: 225ml; R1/3, 75g: 175ml; R1/2, 125g: 125ml

* Samples were tested on the VIDAS ECO assay which generated a Relative Fluorescence Value (RFV) which can be correlated to the *E. coli* O157:H7 concentration

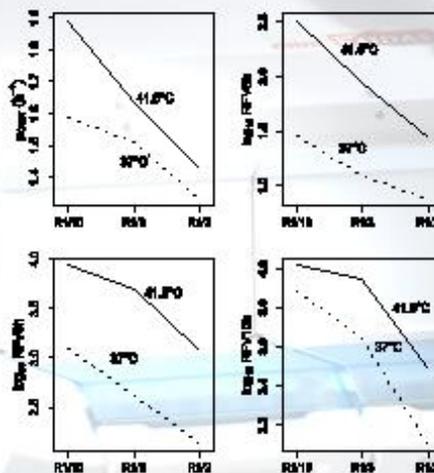
Fig.2 RFV kinetics of the three O157 strains for the six protocols tested



✓ The number of positive samples after 8 hours is significantly greater ($p < 0.001$) at 41.5°C than at 37°C.

✓ At 41.5°C, all the samples are positive for the enrichment ratios R1/10 and R1/3 but only 89% are positive for the ratio R1/2.

Fig.3 Temperature and ratio effects on $R_{RFV, O157}$ and the RFV values



✓ $R_{RFV, O157}$ decreases significantly as the "sample to broth" ratio increases at both temperature

✓ $R_{RFV, O157}$ is significantly greater at 41.5°C than at 37°C for the 3 ratios tested

These test results explain why the RFV increases significantly when the ratio decreases for both temperatures and is higher at 41.5°C; and consequently the faster detection of *E. coli* O157 by the VIDAS when the protocols "25g:225ml" and "75g:175ml" are tested.

Additional experiments : validation tests (with stressed *E. coli* O157:H7 strains) of the optimal protocols determined (25g:225ml and 75g:175ml) at 41.5°C)

The 2 optimal protocols were tested by using ground beef samples artificially inoculated with one of the three O157 strains (from 10^1 to 6 CFU/bag) and frozen 8 days at -40°C. Samples were detected by the VIDAS ECO after 8h (Table. 2).

Table. 2 Positive samples detected by the VIDAS ECO, after 8h incubation

Strain studied	2 ratios tested	
	25g:225ml at 41.5°C	75g:175ml at 41.5°C
Strain 1	3/3	3/3
Strain 2	3/3	3/3
Strain 3	3/3	1/3

✓... but all 75g samples tested were positive after 18h incubation

Conclusion

This study pointed out two new simplified protocols :

Ground beef sample size	25g	75g
Enrichment broth	225 ml of BPW	175 ml of BPW
Incubation temperature	41.5°C	41.5°C
Incubation duration	8 hours	18 hours

These protocols offer the following benefits to the beef industry:

- Results within 9 hours ("25g:225ml" protocol)
- Cost effective by using pooling
- Accuracy
- Simplification of the work flow

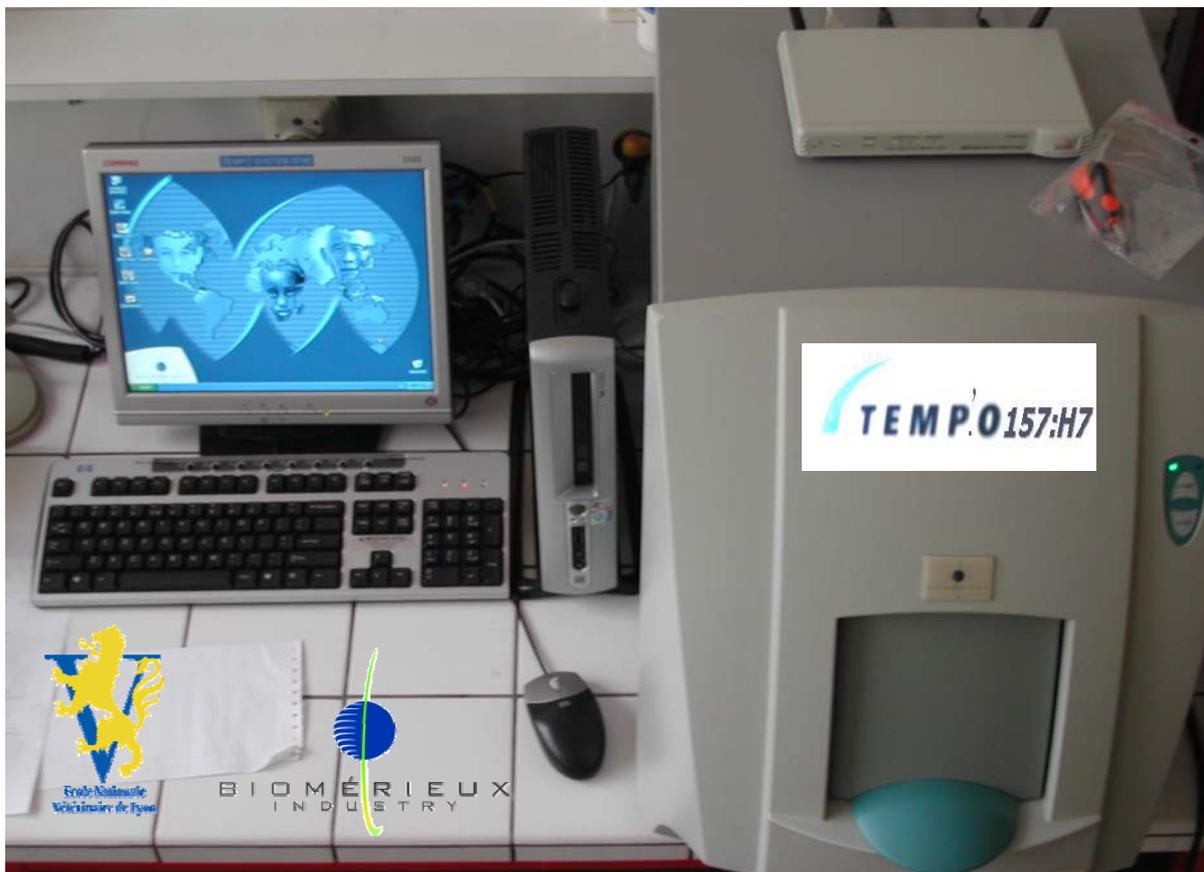
Résumé de la communication n°1

The aim of this study was to optimize the current sampling and testing protocol to detect *E. coli* O157:H7 in ground beef (EN ISO 16140). The current protocol specifies a sample size of 25g successively enriched in two selective broths, with a total enrichment time of 30 hours before screening by the VIDAS ECO assay (bioMérieux). In a first experiment, a one-step enrichment in Buffered Peptone Water (BPW) using three “sample to broth” ratios (25g:225ml, 75g:175ml, 125g:125ml) with a final volume in the stomacher bag of 250ml, two incubation temperatures (37°C and 41.5°C) and an inoculation level of 5 CFU per bag were tested. Regardless of the “sample to broth” ratio and temperature of incubation, 3 out of the 54 samples tested were positive after 6 hours incubation by the VIDAS assay and 39 (72%) were positive after 8 hours incubation. The number of samples positive after 8 hours was significantly greater at 41.5°C incubation than at 37°C ($P < 0.001$). At 41.5°C, all the samples were positive for the ratios 25g:225ml and 75g:175ml but only 89% were positive for the ratio 125g:125ml. The increase in sample size tested can be used to enhance the probability to detect a contaminated grinder batch, but the “sample to broth” ratio should not exceed 75g:125ml for a one-step enrichment of 8 hours at 41.5°C. For a low contamination level (1CFU/25g), this probability is equal to 95% for a sample size of 75g. Nevertheless, it may be increased by using larger stomacher bags. In a second experiment among seven 375g samples of ground beef individually inoculated with 5 cells of *E. coli* O157:H7 and enriched in 750ml of BPW at 41.5°C, all samples were positive after 8 hours. Such a protocol could limit the risk of distributing contaminated batches while taking into account the industry work flow and its economic constraints.

Projet de création d'une nouvelle méthode de détection de *E. coli* O157:H7

Projet TEMP'O157:H7

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le département R&D bioMérieux Industry, Marcy l'Etoile



1. Introduction

C

Cette étude, réalisée en collaboration avec le département R&D de bioMérieux Industry, s'inscrit dans le cadre du projet TEMP'O157:H7[®] visant à mettre sur le marché des industries alimentaires un kit de détection rapide (puis un kit de dénombrement) de *E. coli* O157:H7.

Ce test serait élaboré en utilisant, en partie, la technologie bioMérieux des cartes TEMPO de quantification des indicateurs qualité actuellement commercialisées. En effet, des observations préalables, a priori surprenantes, ont révélé que, dans certaines cartes TEMPO, la fluorescence apparaissait dans un premier temps (à partir de 6h) dans certains des puits de 2,25 µl (petits puits) puis dans les moyens et grands puits. A partir de ces observations, notre objectif était de concevoir une carte capable de détecter *E. coli* O157:H7 dans un délai le plus court possible. Pour mener à bien l'élaboration de cette nouvelle carte, une appréhension et une caractérisation de ces observations ont été menées en évaluant, dans un premier temps, les différences de performance entre les 3 types de puits (2,25 ; 22,5 et 225 µl) puis en essayant, dans un second temps, d'en comprendre les raisons.

Pour se faire, différentes expérimentations ont été effectuées et les principaux résultats obtenus sont relatés dans la présente synthèse. Ces expérimentations constituent des étapes préalables à la conception d'un prototype potentiel. Pour une meilleure compréhension de l'étude, une présentation succincte du système TEMPO est, dans un premier temps, proposée avant d'aborder ensuite les résultats obtenus.

2. Présentation du système TEMPO[®] (bioMérieux)

2.1 Généralités



TEMPO est la première solution automatisée directe pour le dénombrement des indicateurs qualité dans les produits alimentaires. Ce concept est basé sur une miniaturisation de la méthode de dénombrement NPP (Nombre le Plus Probable) en une carte TEMPO multipuits (16 puits de 2,25 µl, 16 puits de 22,5 µl et 16 puits de 225 µl) (Photo 11). L'offre TEMPO inclut, à ce jour, les tests TEMPO

TVC (dénombrement de la flore totale), TEMPO EC (dénombrement des *E. coli*), TEMPO EB (dénombrement des entérobactéries) et TEMPO TC (dénombrement des coliformes totaux). Ces tests TEMPO sont composés d'un flacon de milieu de culture et d'une carte spécifique au test. La solution TEMPO présente plusieurs atouts marketing : i.e. une facilité d'utilisation, une traçabilité complète des analyses ainsi qu'une économie de temps et d'argent pour l'industriel. Le système TEMPO est composé de deux postes de travail reliés par communication sans fil WIFI: ① un poste de préparation pour réaliser l'ensemencement, le remplissage et le scellage des cartes TEMPO ; ② un poste de lecture pour effectuer la lecture et l'interprétation des cartes TEMPO (Photo 10).



Photo 10 : Poste de préparation (TEMPO Filler) et poste de lecture (TEMPO Reader).

2.2 Principe et protocole d'utilisation : cas du TEMPO EC

Le test TEMPO EC est donc un test automatisé sur TEMPO permettant le dénombrement des *Escherichia coli* en 24 heures dans les produits alimentaires. Il est composé d'un flacon de milieu de culture et d'une carte spécifique au test. Le milieu de culture est ensemencé avec l'échantillon à analyser. L'ensemble est transféré de façon homogène dans les 48 puits de trois volumes différents de la carte grâce au TEMPO Filler. Au cours de l'incubation (24h à 37°C), les *Escherichia coli* présents dans la carte dégradent le substrat du milieu de culture et permettent l'apparition d'un signal fluorescent détecté par le TEMPO Reader. Ainsi, en fonction du nombre et de la taille des puits positifs, le système déduit, selon la méthode NPP, le nombre de *E. coli* présents initialement dans l'échantillon. La gamme de lecture du TEMPO s'étend de 1 UFC.g⁻¹ à 8 log₁₀ UFC.g⁻¹ en fonction des

dilutions effectuées (e.g. dilution au 1/10, gamme de lecture : 3 à 12 000 UFC.g⁻¹). Un schéma du principe et du protocole de réalisation du test EC figure ci-dessous (Photo 11).

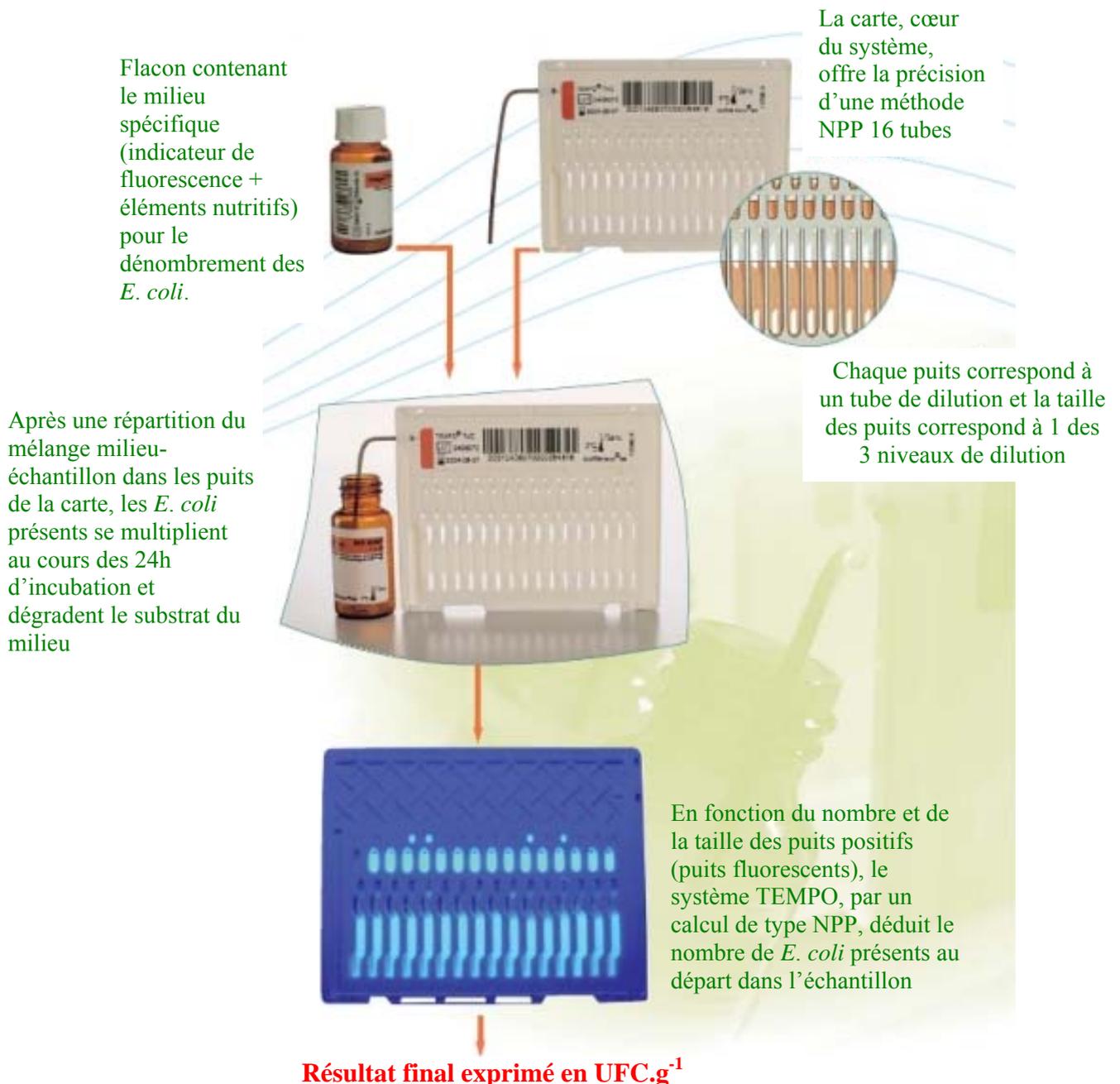


Photo 11 : Principe et protocole de réalisation du test TEMPO EC (bioMérieux, Marcy, France).

3. Performance des milieux d'enrichissement

Le but de cette première expérimentation était d'étudier les performances des milieux TEMPO EC et TSB (Tryptone Soya Broth), d'une part, en terme de croissance bactérienne et, d'autre part, en terme de temps d'apparition de la fluorescence dans les cartes TEMPO EC. L'objectif final était de mettre en évidence un milieu d'enrichissement compétitif (universel, performant et peu coûteux) pour la carte de détection O157:H7.

3.1 Performance en terme de croissance

3.1.1 Matériels et méthodes

Pour étudier les performances des 2 milieux d'enrichissement précités, un suivi simultané de la croissance de la microflore aérobique mésophile totale (MAMT) du steak haché et de 2 souches de STEC artificiellement inoculées chacune dans 25g de steak haché a été réalisé dans les milieux TEMPO EC et TSB à 37 et 40°C. Les niveaux d'inoculum des souches de STEC (qui ont été choisis en fonction des niveaux de contamination habituellement retrouvés dans la réalité) étaient compris entre 0 \log_{10} UFC.ml⁻¹ et 1 \log_{10} UFC.ml⁻¹ dans les 250 ml de milieu.

Des prélèvements et dénombrements ont été réalisés toutes les 2 heures de 0 à 24h afin de déterminer le nombre de cellules bactériennes viables pour chacune des 2 microflores. Les cinétiques de croissance des deux flores ont ensuite été modélisées à l'aide de modèles mathématiques adéquats, du type modèle de Buchanan (cf. Chapitre 2 du Mémoire Bibliographique).

3.1.2 Résultats

En terme de croissance des souches STEC, aucune différence n'apparaît entre le milieu TEMPO EC et le milieu TSB. Les taux spécifiques de croissance des 2 souches et pour les 4 protocoles varient entre 1.9 et 2.3 h⁻¹. En outre, aucun des 2 milieux n'induit de phase de latence pour la MAMT alors qu'une phase de latence comprise entre 1.9 et 2.5 heures est observée pour les souches de STEC dans le milieu TEMPO EC et TSB à 37°C et 40°C. Enfin, quelque soit l'inoculum initial (0 ou 1 \log_{10} UFC.ml⁻¹ en STEC, le taux spécifique de croissance (μ) semble relativement proche et seul le niveau maximal (y_{\max}) de croissance diffère.

En terme de croissance, le milieu TEMPO EC ne semble pas indispensable à la carte TEMPO EC. Néanmoins, qu'en est-il de ses performances avec le principe de révélation par fluorescence dans la carte TEMPO EC ? En effet, l'apparition de la fluorescence est la conséquence de 2 événements : une croissance bactérienne minimale mais également une induction enzymatique suffisante. Le paragraphe suivant relate l'étude menée pour évaluer les performances des milieux TSB et TEMPO EC en terme d'apparition de la fluorescence.

3.2 Performance en terme de temps d'apparition de la fluorescence

3.2.1 Matériels et méthodes

Pour étudier les performances des 2 milieux en terme de temps d'apparition de la fluorescence, un suivi du nombre de puits positifs (2,25 ; 22,5 et 225) a été réalisé à l'aide du logiciel R&D (QICard Runner).

Dans ce but, un lait entier pasteurisé a été inoculé avec une suspension de MAMT de lait cru (1400 UFC.ml⁻¹) et une suspension de *E. coli* isolés de fèces (700 UFC.ml⁻¹). Puis, 25 ml de ce lait ont été dilués dans respectivement 225 ml de TSB (+ substrat spécifique et inducteurs enzymatiques) et TS. Après 40 minutes de régénération, 3 x 4 ml de TSB ont été introduits directement dans 3 cartes alors que 3 x 4 ml de TS ont été introduits préalablement dans 3 flacons TEMPO EC puis ensuite dans 3 cartes.

Des lectures des 3 cartes contenant le milieu TEMPO EC et des 3 cartes contenant le milieu TSB ont été réalisées toutes les heures à partir de 5h jusque 24h (un point final a été réalisé à 32h). Le protocole ci-dessous (Figure 15), résumant les différentes étapes de l'expérience, n'a été réalisé qu'une seule fois.

3.2.2 Résultats

Les résultats observés sur la figure 16 montrent que les temps d'apparition de la fluorescence sont supérieurs lorsque le milieu TSB (vs EC TEMPO) est utilisé comme milieu d'enrichissement. En effet, la médiane des temps de détection des puits positifs de 2,25 µl se situe à 10h et 17h lorsque les milieux TEMPO EC et TSB sont respectivement utilisés. En ce qui concerne les puits de 22,5 et 225 µl, aucune apparition de fluorescence n'est encore observée au bout de 32h avec le milieu TSB.

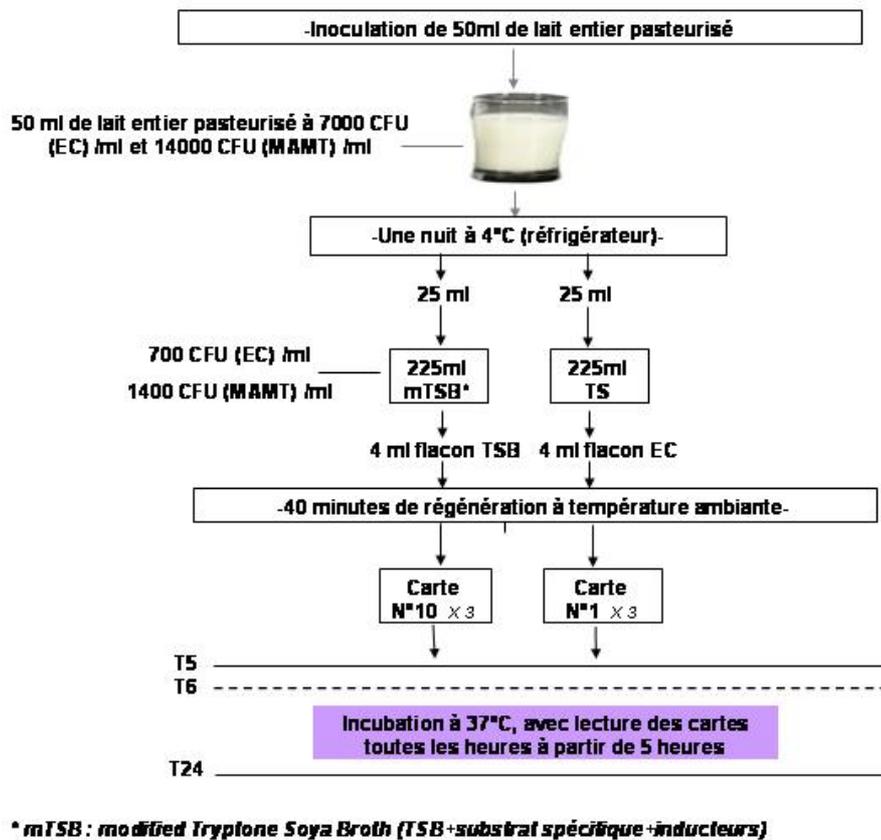


Figure 15 : Protocole expérimental pour le suivi de la fluorescence par puits et l'évaluation de la performance des 2 milieux d'enrichissement.

3.3 Conclusion

Les milieux TEMPO EC et TSB sont équivalents en terme de performance de croissance. Néanmoins, en terme d'apparition de fluorescence le milieu TEMPO EC est plus performant et il semble donc y avoir un effet milieu sur l'induction enzymatique. Ainsi, la variabilité du temps d'apparition de la fluorescence par puits positif se voit augmentée lorsque le milieu TSB est utilisé.

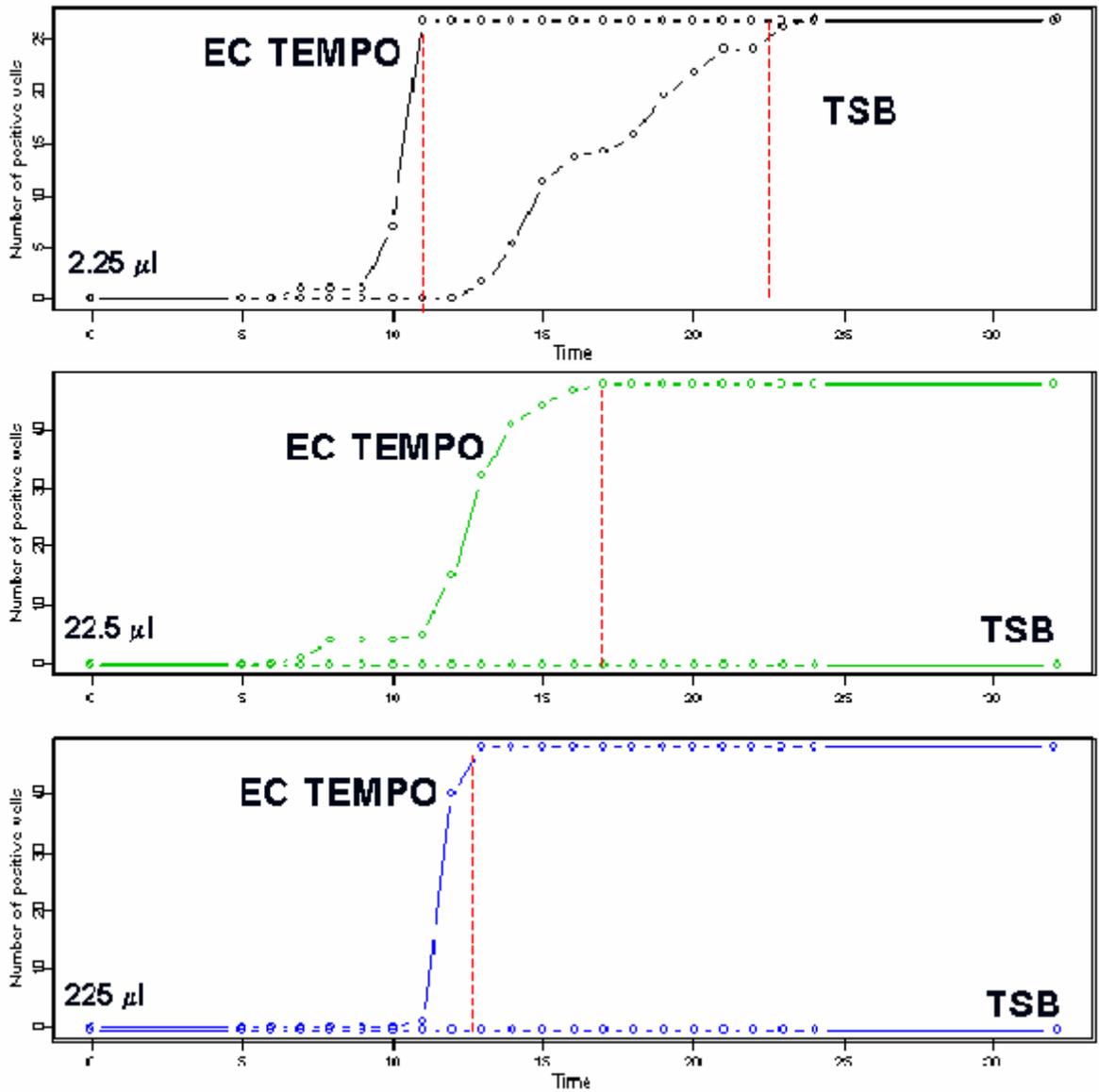


Figure 16 : Cinétiques d'apparition de la fluorescence dans les puits de 2,25 ; 22,5 et 225 µl avec les milieux TEMPO EC et TSB.

4. Suivi du temps d'apparition de la fluorescence

L'objectif de cette expérimentation était de caractériser les performances des 3 catégories de puits de la carte en fonction de différents ratios *E. coli*/MAMT (de différentes matrices alimentaires). Néanmoins, la MAMT qui est sensible au milieu sélectif TEMPO EC a été remplacée, dans cette étude, par *Salmonella* (non sensible) afin de ne pas influencer les ratios choisis et donc ne pas biaiser les résultats.

L'objectif final était de mettre en évidence un type de puits potentiellement optimal qui composerait par la suite la carte de détection O157:H7.

4.1 Rappel théorique

Des observations préalables ont montré que, pour une même carte, la fluorescence apparaissait en premier lieu dans certains des 16 petits puits (2,25 µl) composant la carte TEMPO puis dans les autres. Une hypothèse envisageable pour expliquer ces observations est basée sur une variabilité plus importante du ratio « nombre de bactéries cibles sur nombre de bactéries environnantes » dans la série des petits puits (pour une carte donnée). De même, en présence de bactéries environnantes, le ratio *E. coli*/flore environnante sera plus variable dans cette même catégorie.

Pour comprendre ce phénomène, des simulations, dans un premier temps, de la répartition du nombre de cellules bactériennes de la flore EC (*E. coli*) (n_{EC}) puis, dans un second temps, de la répartition simultanée des flores MAMT (n_{MAMT}) et EC (n_{EC}) dans les puits de différents volumes (v) avec $C_{EC}=700$ UFC.ml⁻¹ et $C_{MAMT}=5000$ UFC.ml⁻¹ ont été réalisées. La variabilité de la concentration en *E. coli* (C_{EC}) simulée par type de puits ainsi que celle des rapports (n_{EC}/n_{MAMT}) simulés obtenus sont représentées respectivement sur les figures 17 et 18. Il convient de noter que n_{MAMT} et n_{EC} ont été respectivement tirés dans une loi de *Poisson* de paramètres $\lambda = C_{MAMT} * v$ et $\lambda = C_{EC} * v$, en supposant une répartition homogène des bactéries dans le bouillon initial.

En effet, même si la concentration moyenne théorique par type de puits est identique (0,7 UFC.µl⁻¹), une variabilité importante de la répartition de n_{EC} pour les petits puits induit des concentrations en *E. coli*, pour certains d'entre eux, beaucoup plus élevées que pour les autres petits puits et également que pour les autres types de puits (22,5 et 225µl) (Figure 17). Le même phénomène est observé avec le rapport n_{EC}/n_{MAMT} , qui se voit plus élevé pour certains des petits puits (Figure 18).

Cette variabilité pourrait-elle alors expliquer l'apparition « précoce » de la fluorescence dans ces puits ? Deux phénomènes peuvent être envisagés. Le premier est un phénomène lié à la croissance avec un niveau initial en *E. coli* (y_0) plus élevé dans certains petits puits (dû à la variabilité) et, en conséquence, une concentration seuil en bactéries cibles (pour qu'il y ait apparition de fluorescence) plus rapidement atteinte. En présence de flore(s) environnante(s), le même phénomène pourrait être observé, additionné d'une croissance potentiellement meilleure (interactions autre que compétition par rapport au substrat, puisqu'il est spécifique à *E. coli*) due à un ratio EC/MAMT plus élevé dans certains des petits puits.

Le deuxième phénomène pouvant être envisagé est lié à la révélation, avec une détection de l'émission de la fluorescence plus aisée (donc plus rapide) lorsque le ratio est élevé car la flore environnante, réduite dans ce cas, ne provoquerait pas de bruit de fond qui puisse alors freiner l'émission.

Outre cet « effet répartition et/ou ratio », peut-il y avoir des différences entre les types de puits (« effet forme » du puits, « effet gravité »...) pour des ratios identiques ? L'étude expérimentale réalisée a pour objectif de répondre également à cette question.

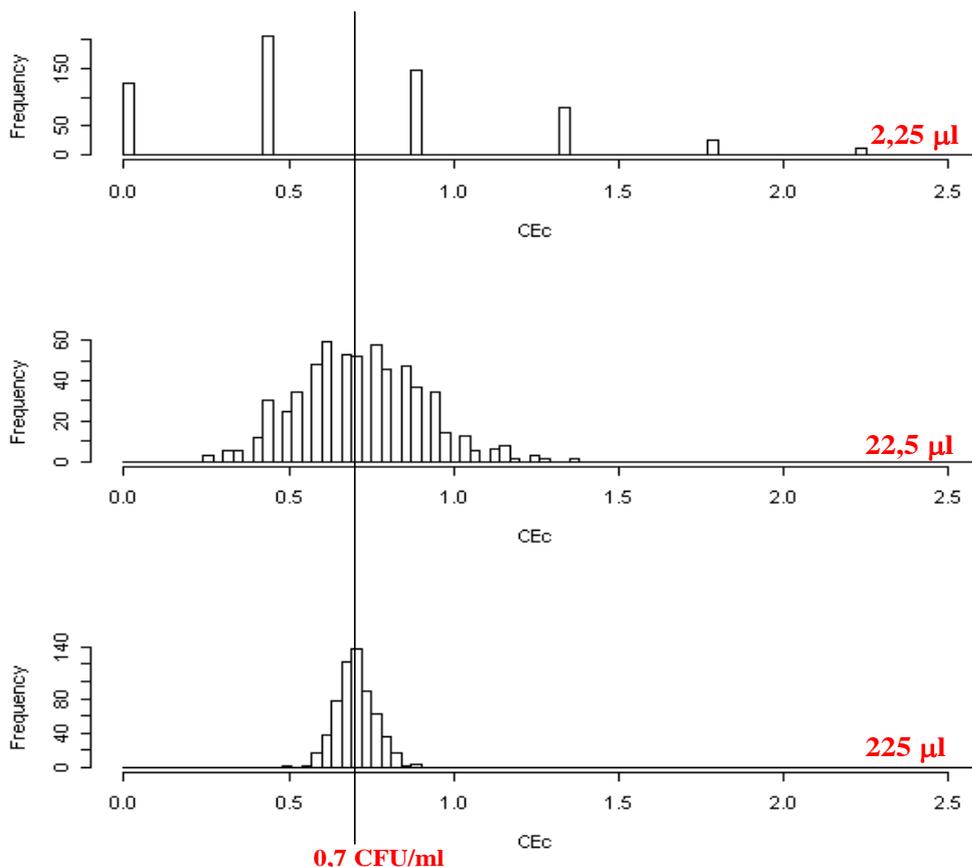


Figure 17 : Histogrammes de fréquence des concentrations en *E. coli* simulées pour chaque type de puits pour une concentration de la suspension dispensée de 700 UFC.ml⁻¹.

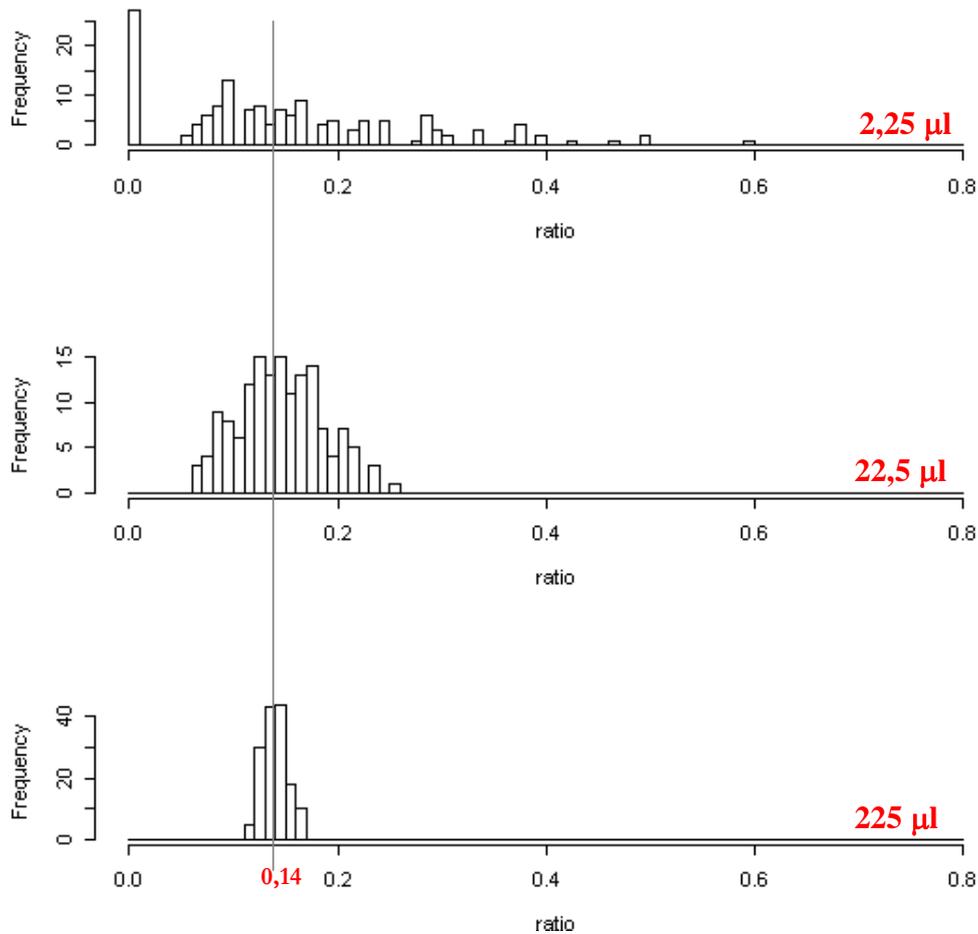


Figure 18 : Histogrammes de fréquence des ratios simulés pour chaque type de puits, pour une suspension initiale avec 700 UFC.ml⁻¹ de EC et 5000 UFC.ml⁻¹ de MAMT.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Expérimentations

Le plan d'expérience mené croise deux facteurs fixes dont les modalités sont détaillées dans le Tableau XVIII:

Facteurs étudiés	Modalités associées (nombre)
Ratio EC/ <i>Salmonella</i>	1/2 1/200 1/2000 (3)
Taille des puits	2,25 22,5 225 µl (3)

Tableau XVIII : Plan d'expérience.

Trois répétitions ont été effectuées pour chaque condition, soit un nombre total de 27 expériences. Chaque condition est réalisée avec une contrainte fixée d'un nombre théorique de 1,6 UFC/puit, pour obtenir 80% des puits positifs au terme des 24h d'incubation. En effet, pour observer une variabilité dans les puits, la concentration initiale en bactéries ne doit pas être trop élevée. Trois expériences en souche pure ont également été réalisées (à contrainte fixée d'un nombre théorique de 1,6 UFC/puits). Toutes ces expériences ont été réalisées avec le milieu TEMPO EC (étant donné les faibles performances du milieu TSB, exposées dans la Partie 3) et à l'aide d'une seule souche de *E. coli*.

Le plan détaillé du protocole expérimental est présenté dans le Tableau XIX :

Condition	Rapport EC/Salmonella	Taille des puits (UFC.µl ⁻¹)	Inoculum EC (UFC.ml ⁻¹)	Inoculum Salmonella (UFC.ml ⁻¹)
N°1	1/2	2,25	700	1400
N°2	1/200	2,25	700	140 000
N°3	1/2000	2,25	700	1 400 000
N°4	1/2	22,5	70	140
N°5	1/200	22,5	70	14000
N°6	1/2000	22,5	70	140 000
N°7	1/2	225	7	14
N°8	1/200	225	7	1400
N°9	1/2000	225	7	14 000

Tableau XIX : Protocole expérimental détaillé.

4.2.2 Analyse des données

Les données brutes obtenues par le logiciel de lecture R&D à l'issue de l'étude ont été analysées par le logiciel « SAS ». Ce logiciel a permis, à l'aide d'un algorithme adapté aux données brutes, d'établir pour chacune des conditions le nombre de puits positifs pour chaque type de puits (2,25 ; 22,5 et 225 µl) et chaque temps de mesure. Pour chaque type de puits, le temps d'apparition de la fluorescence a ainsi été déduit. Ces nouvelles données ont ensuite été analysées statistiquement à l'aide du logiciel « R ». Etant donné l'interaction existante entre les effets « type de puits » et « ratio », ajoutée à une distribution des données ne suivant pas une loi normale; un test non paramétrique (de « Kruskal-Wallis ») a été réalisé sur le temps d'apparition de la fluorescence par puits pour chacune des conditions. Une analyse

pour chaque ratio de l'effet type de puits et une analyse pour chaque type de puits de l'effet ratio ont ainsi été effectuées.

4.3 Résultats

Le test de « Kruskal-Wallis » a mis en évidence des effets significatifs du facteur ratio pour chacun des 3 types de puits ($10^{-16} < P < 10^{-5}$) ainsi que du facteur type de puits pour chacun des 3 ratios étudiés ($1/2$, $1/200$ et $1/2000$) ($10^{-16} < P < 10^{-9}$).

Les graphiques ci-dessous (Figures 19 et 20) illustrent et complètent les résultats du test précédemment évoqués :

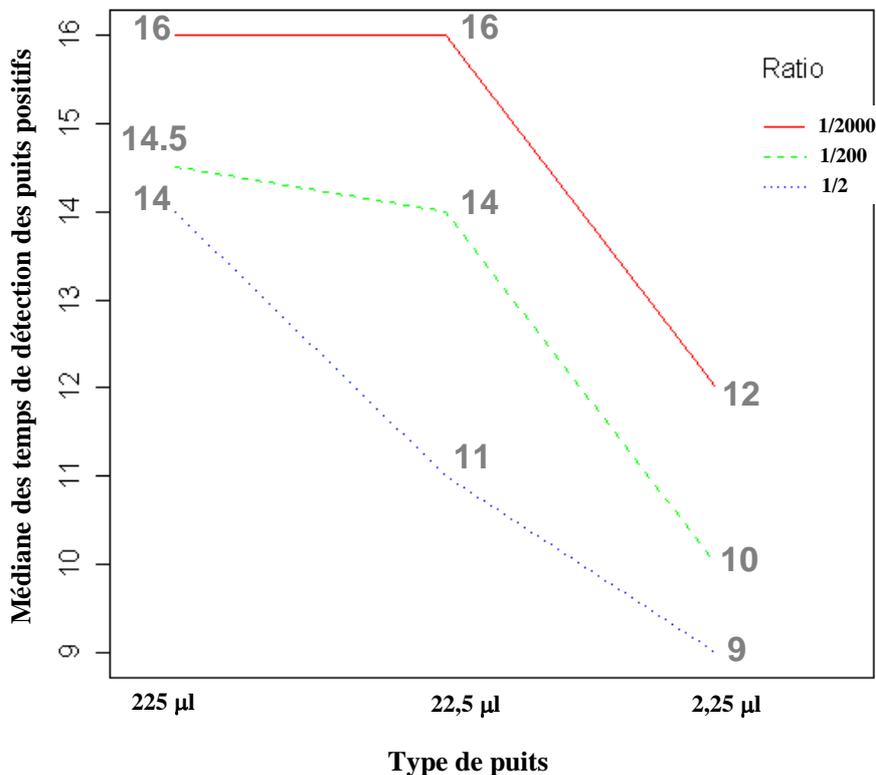


Figure 19 : Médiane des temps de détection calculée sur environ 38 puits positifs pour chaque condition.

La médiane (i.e. 50% des puits positifs observés) a été utilisée dans cette étude pour juger avec robustesse de la performance des différents puits. La figure 19 montre ainsi que les puits de 2,25µl sont plus performants que les 2 autres types de puits (en terme de vitesse

d'apparition de la fluorescence) pour la détection de *E. coli* et ce, quelque soit le ratio testé à nombre théorique de cellules par puits identique. En outre, il apparaît sur ce graphique que le temps d'apparition de la fluorescence est retardé lorsque le ratio *EC/Salmonella* diminue. Le temps de détection, lorsque le ratio diminue de 1/2 à 1/2000, passe de 9 à 12 h pour les puits de 2,25 μ l, de 11 à 16 h pour les puits de 22,5 μ l et de 14 à 16 h pour les puits de 225 μ l. Il semble donc que le ratio et le temps d'apparition de la fluorescence soient corrélés négativement. Le graphique ci-dessous (Figure 20) représente pour chaque type de puits les temps d'apparition des puits positifs observés en fonction du ratio. Lorsque le ratio diminue la variabilité du temps d'apparition des puits positifs augmente, et ceci, quelque soit le type de puits (2,25 ; 22,5 et 225 μ l).

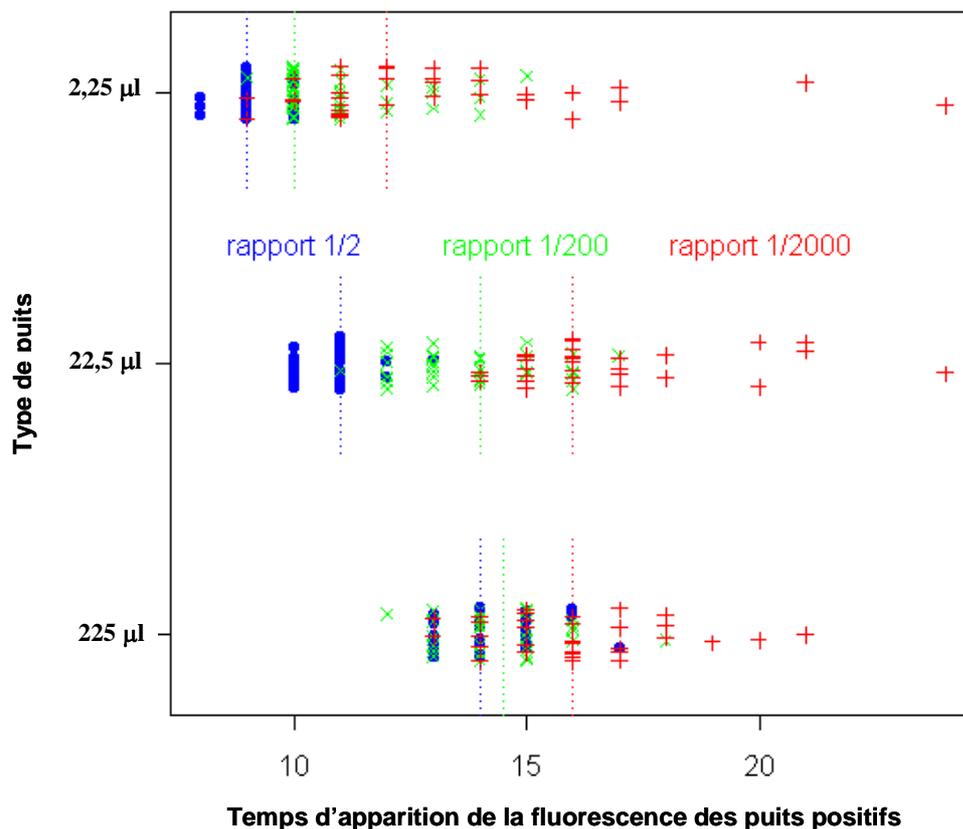


Figure 20 : Temps d'apparition de la fluorescence des puits positifs pour les 3 ratios et les 3 types de puits étudiés.

4.4 Discussion

Les résultats précédents (basés sur la médiane des temps de détection des puits positifs) ont démontré une meilleure performance des petits puits (2,25 μ l) en terme de vitesse d'apparition de la fluorescence. Evoquons, dans cette partie, le temps auquel apparaissent les premiers puits positifs de chaque catégorie (2,25 ; 22,5 et 225 μ l) et pour les différents ratios (Tableau XX).

Ratio	Puits de 225 μ l	Puits de 22,5 μ l	Puits de 2,25 μ l
1/1	11	9	7
1/2	13	10	8
1/200	13	12	10
1/2000	13	14	10

Tableau XX : Temps d'apparition (heures) des premiers positifs dans chaque catégorie de puits et pour les différents ratios testés.

On peut alors imaginer un kit de détection pour pathogène(s) qui soit basé sur une carte TEMPO modifiée et sur le principe de révélation par fluorescence. Cette carte TEMPO modifiée pourrait être composée soit uniquement de puits de 2,25 μ l [carte 2,25], soit de puits de 22,5 μ l [carte 22,5] ou soit de puits de 225 μ l [carte 225].

Le test de détection serait alors positif dès qu'au moins un puits de la carte considérée flasherait (i.e. les résultats figurant dans le Tableau XX).

Un test de détection qui serait composé d'une carte avec des puits de 2,25 μ l serait positif dès 10h avec un ratio (relativement défavorable) de 1/2000 alors que les tests de détection composés par des cartes de puits de 22,5 et 225 μ l seraient tout de même positifs vers 13-14h (différentiel de 3-4h).

D'autre part, on peut imaginer un autre concept de diagnostic à double fonction. Ce dernier serait basé sur un suivi de cinétique (i.e. principe de fonctionnement du VITEK) d'apparition de fluorescence dans une carte TEMPO (actuelle, i.e. sans modification de structure) et qui aurait à la fois une fonction de détection et de dénombrement.

En effet, dans le cas d'une contamination pathogène, les puits de 2,25 μ l flasheraient en premier entre 7 et 10 heures, ce qui avertirait ainsi le client d'une contamination pathogène dès 7-10h (lui laissant la possibilité d'agir en fonction du résultat) puis, après 24h, il aurait la

possibilité de quantifier cette contamination. Toutefois, si le niveau de contamination est relativement faible, la probabilité pour qu'une bactérie se retrouve dans les petits puits diminue et donc la probabilité, qu'au moins un des puits de 2,25µl flashe, diminue. Compte tenu des faibles contaminations en *E. coli* O157:H7 dans les aliments, le test de détection deviendrait alors positif aux environs de 14h (temps de détection des grands puits).

4.5 Conclusion

Le type de puits et le ratio *EC/Salmonella* influencent significativement le temps d'apparition de la fluorescence (la fluorescence étant la conséquence d'une croissance bactérienne et d'une induction enzymatique). En effet, les puits de 2,25 µl sont plus performants (en terme de vitesse d'apparition de la fluorescence) pour la détection de *E. coli* :

- Au ratio 1/2; ils flashent environ 2h avant les puits de 22,5µl et 5h avant les puits de 225 µl ;
- Au ratio 1/200; ils flashent environ 4h avant les puits de 22,5 µl et 4,5h avant les puits de 225 µl ;
- Au ratio 1/2000; ils flashent en moyenne 4h avant les puits de 22,5 µl et 4h avant les puits de 225 µl.

Quelles sont les raisons de ces différences de temps d'apparition de fluorescence précédemment exposées entre les puits de 2,25 ; 22,5 et 225µl ? La meilleure performance des petits puits est-elle due :

- à un **effet volume** (avec une concentration supérieure de substrat dégradé dans des puits de 2,25µl que dans les autres, pour une quantité de bactéries identique dans les 3 types de puits) ?
- à une **différence d'induction enzymatique** en fonction de la forme du puits (meilleure oxygénation dans les petits puits) ?
- à des **différences de croissance** dans les 3 types de puits (liées à des effets « gravité » et/ou « forme du puits »)?

Pour répondre à cette interrogation, un suivi de croissance de *E. coli* O157 dans les trois types de puits a été réalisé (cf. paragraphe suivant).

5. Suivi de croissance dans les 3 types de puits

Cette étude, en suivant la cinétique de croissance de *E. coli* O157 dans les 3 types de puits afin de déterminer le taux spécifique de croissance (μ) de *E. coli* O157 associé à chaque type de puits, avait pour objectif principal d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle une différence de croissance dans les 3 types de puits expliquerait les différences de performance observée entre les types de puits en terme de temps d'apparition de la fluorescence. Si l'hypothèse n'est pas vérifiée, les différences entre les puits en terme de temps d'apparition de la fluorescence seraient alors principalement du *a priori* à un effet volume.

Une différence d'induction enzymatique (due elle-même à une oxygénation différente du type de puits en fonction de leur forme et volume) pourrait être également considérée dans l'explication des différences de performance entre les types de puits en terme de temps d'apparition de la fluorescence. Cette présente étude n'investigue pas cette dernière hypothèse.

5.1 Matériels et méthodes

Pour déterminer le taux spécifique de croissance (μ) de *E. coli* O157 associé à chaque type de puits, deux protocoles ont été effectués. Le premier (5.1.1) a été réalisé avec une seule carte par prélèvement, ce qui implique une concentration identique de la bactérie cible dans chaque puits, mais une quantité différente de bactéries par puits. Le second (5.1.2) a été effectué avec une même quantité de bactéries par puits, en utilisant en conséquence 3 cartes par prélèvement (afin de maîtriser la quantité de bactérie voulue par type de puits). L'intérêt de ce deuxième protocole est de caractériser le taux spécifique de croissance d'une cellule dans un puits de 2,25 ; 22,5 et 225 μ l afin d'observer d'éventuelles différences. En effet, l'hypothèse envisagée est qu'une cellule pourrait potentiellement mieux se développer dans un environnement plus confiné comme celui des petits puits. Ce protocole, en cas de différence du taux spécifique de croissance des 3 types de puits, conforterait alors l'hypothèse selon laquelle les effets « forme » et « gravité » interviennent dans la croissance de *E. coli* O157.

5.1.1 Expérimentations avec une quantité de *E. coli* O157 différente dans les 3 types de puits

Le protocole expérimental est représenté sur la figure 21. 50ml d'eau stérile ont été inoculés avec 2000 UFC.ml⁻¹ pour que 99% des petits puits soient positifs, afin de ne pas sous-estimer leur taux de croissance associé. 4 ml de cet inoculum ont ensuite été transférés dans 10 cartes, servant aux prélèvements réalisés toutes les heures, de 0 à 6h, puis toutes les deux heures, de 6h à 12h. Le protocole de prélèvement des puits est résumé sur la figure 22. Pour un prélèvement, le contenu des 16 puits de chacune des 3 catégories est récupéré et homogénéisé. 20 µl de chaque contenu sont transférés à nouveau dans une carte TEMPO EC et incubés 24 h pour connaître le nombre d'UFC.ml⁻¹ présent dans les puits à chaque temps de prélèvement.

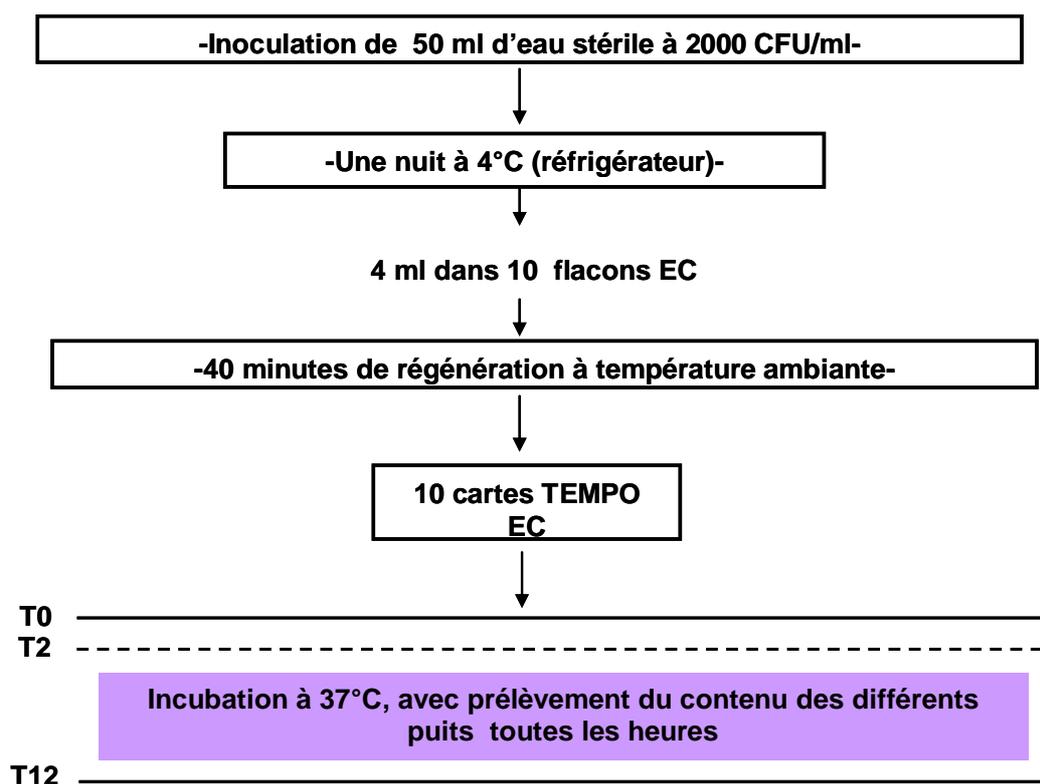


Figure 21 : Protocole expérimental du suivi de croissance dans les 3 types de puits.

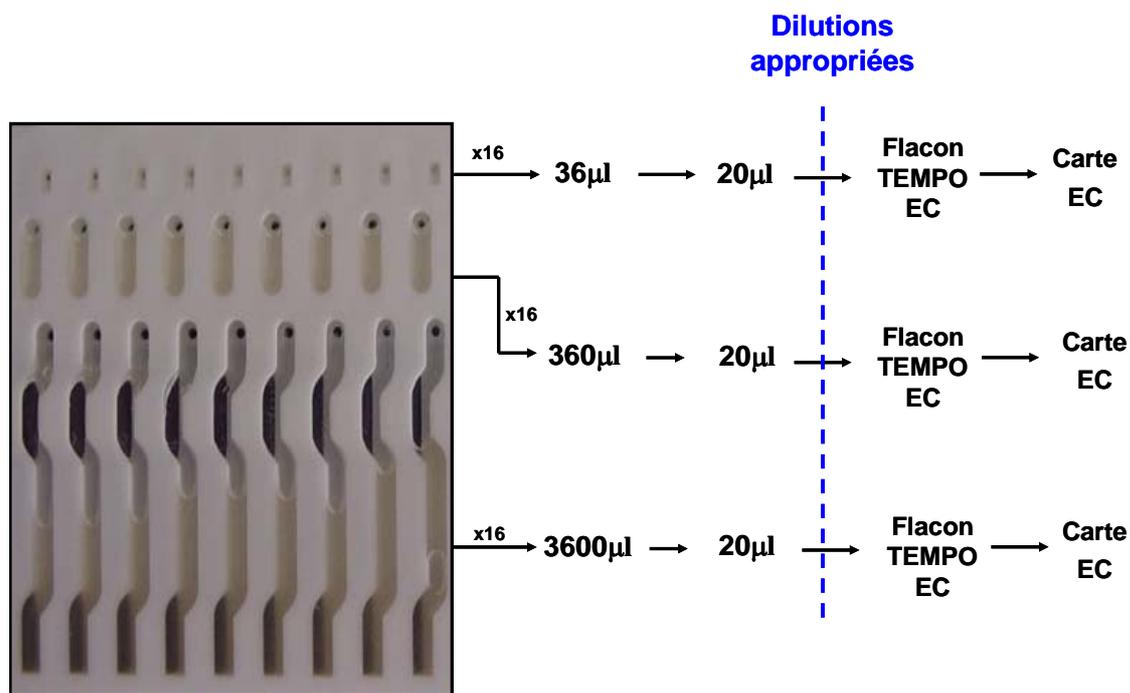


Figure 22 : Protocole de prélèvement des 3 catégories de puits.

5.1.2. Expérimentations avec une quantité de *E. coli* O157 identique dans les 3 types de puits

Le protocole expérimental est représenté sur la figure 23. 3 x 50ml d'eau stérile ont été inoculés avec 700, 70 et 7 UFC.ml⁻¹ pour que 80% des puits des 3 catégories respectives soient positifs. 4 ml de cet inoculum sont ensuite transférés dans 3 x 10 cartes qui serviront aux prélèvements réalisés toutes les heures, de 0 à 6h, puis toutes les deux heures, de 6h à 12h. La figure 24 retrace le protocole de prélèvement. Pour un prélèvement donné, le contenu des 16 puits de chacune des 3 catégories est récupéré et homogénéisé puis 20µl, 200 µl et 2000 µl du contenu respectivement des petits, moyens et grands puits sont transférés à nouveau dans une carte TEMPO EC et incubés 24h pour déterminer le nombre d'UFC.ml⁻¹ présentes dans les puits à chaque temps de prélèvement.

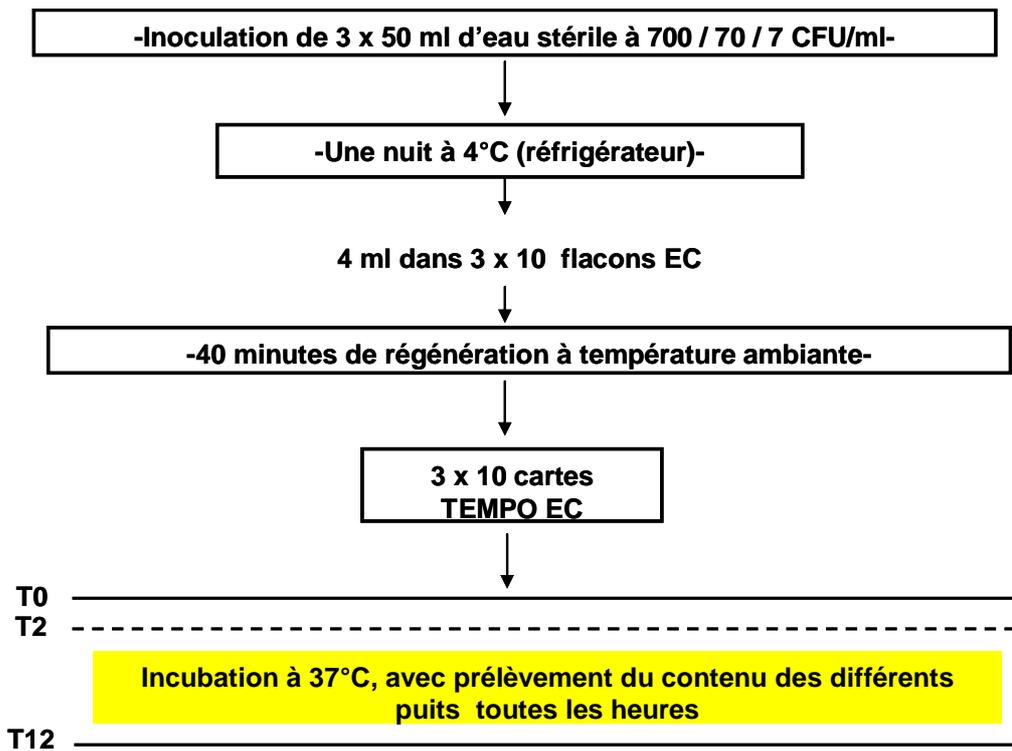


Figure 23 : Protocole expérimental du suivi de croissance dans les 3 types de puits.

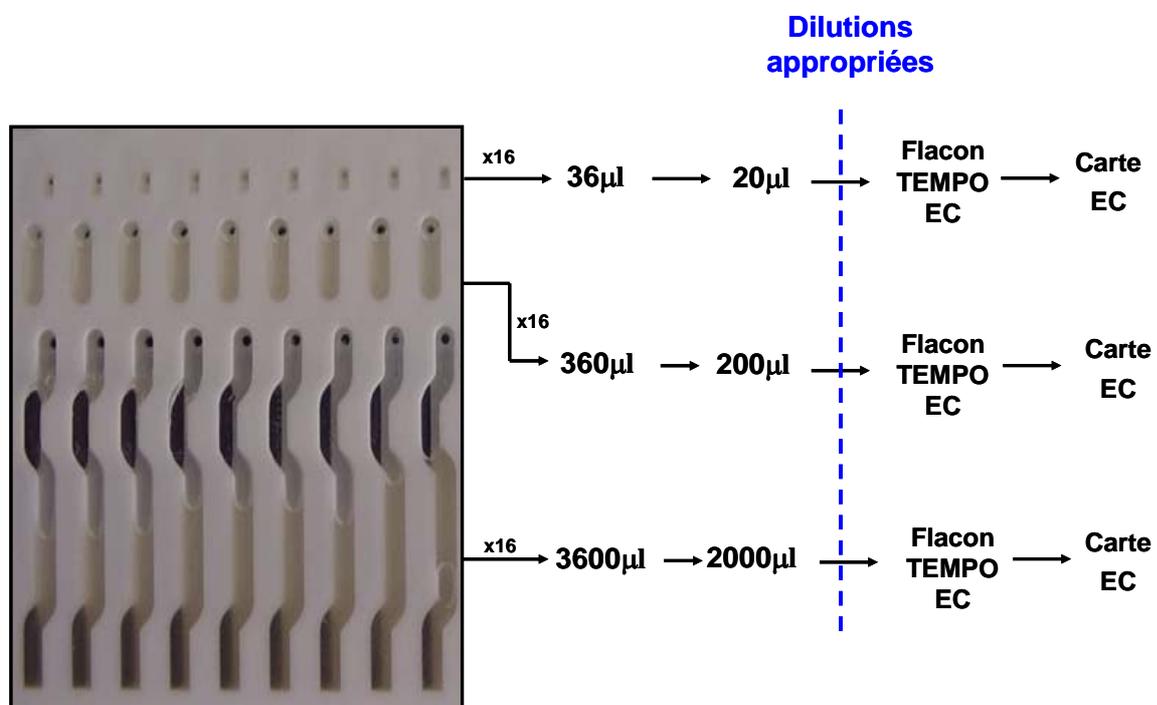


Figure 24 : Protocole de prélèvement des 3 catégories de puits.

5.1.3 Analyse des données

Le logiciel de lecture TEMPO Reader a déterminé pour chaque type de puits et à chaque temps de prélèvement, le nombre d'UFC.ml⁻¹ présentes dans le flacon TEMPO EC de 4ml. Ces résultats ont ensuite été recalculés en log₁₀ UFC.ml⁻¹ par puits à chaque temps de prélèvement. La cinétique de croissance de chaque type de puits a ensuite été ajustée par le modèle 1 et le modèle 2 (cf. Chapitre 1 du Mémoire Expérimental).

5.2 Résultats

5.2.1 Expérimentations avec des quantités différentes dans les 3 types de puits (concentration constante)

Après comparaison (test F des modèles emboîtés) des résultats de cinétique obtenus par les modèles 1 et 2, le modèle 2 (avec phase de latence) a été choisi pour ajuster les cinétiques de croissance observées pour les 3 types de puits. Les cinétiques de croissance observées de *E. coli* O157 dans les 3 types de puits sont relativement proches et un ajustement global a donc été réalisé à l'aide du modèle 2 (Figure 25). Ainsi, le taux spécifique de croissance (μ) (lorsque la concentration est égale dans les 3 types de puits) dans chaque type de puits est équivalent et égal à 1.7 h⁻¹, ce qui n'implique aucune différence de croissance entre les 3 types de puits. Le temps maximal (t_{\max}) de croissance est égale à 8h, ce qui correspond à une concentration maximale (y_{\max}) de croissance égale à 8,8 log₁₀ UFC.ml⁻¹. Le temps de latence (λ) est d'environ 1h.

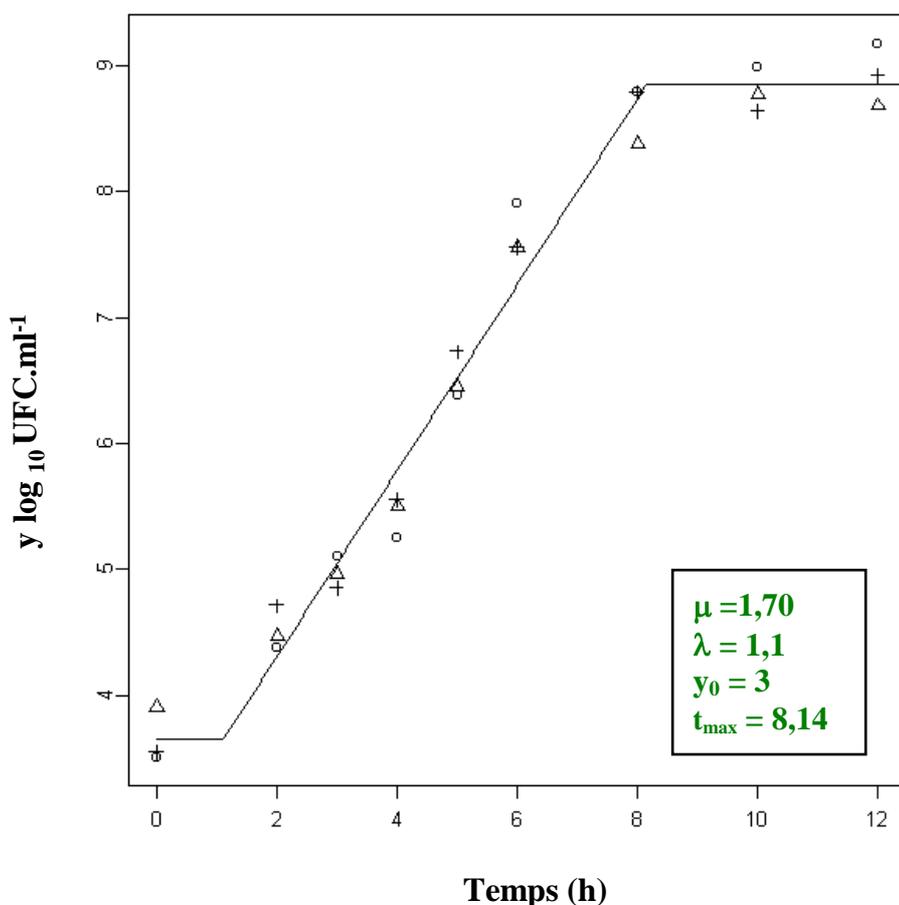


Figure 25 : Cinétique de croissance de *E. coli* O157 dans les 3 types de puits. ○ : puits de 2,25 μ l ; Δ : puits de 22,5 μ l ; + : puits de 225 μ l.

5.2.2 Expérimentations avec des quantités identiques dans les 3 types de puits (concentrations différentes)

Après comparaison (test F des modèles emboîtés) des résultats de cinétique obtenus par les modèles 1 et 2, le modèle 2 (avec phase de latence) a été choisi pour ajuster les cinétiques de croissance observées pour les petits et moyens puits. Concernant les grands puits, un modèle du même type a été utilisé mais sans freinage (sans phase stationnaire). En effet, le peu de données disponibles en fin de phase exponentielle pour les grands puits ne nous a pas permis de caractériser cette dernière phase. Néanmoins, la figure 26 montre que le profil des cinétiques de croissance de *E. coli* O157 observé dans les 3 types de puits est relativement proche et les modèles 2 et 3 ont estimés un taux spécifique de croissance (μ)

dans chaque type de puits environ égal à 2 h^{-1} . Concernant le temps de latence (λ), il est compris entre 1 h et 1,3h.

Seule une différence au niveau du temps maximal (t_{\max}) de croissance est observée : elle est égale à 8h pour les puits de $2,25\mu\text{l}$ et 8,6h pour les puits de $22,5\mu\text{l}$. Le t_{\max} des puits de $225\mu\text{l}$ semble supérieur à 10h mais ne peut-être qu'estimé, compte tenu du faible nombre de points au début de la phase stationnaire. Cette différence s'explique par la quantité initiale identique en *E. coli* O157 dans chaque niveau de puits (donc une concentration des puits de $22,5$ et 225 , respectivement environ 10 et 100 fois inférieure à celle des petits puits), expliquant ainsi le décalage du début de la phase stationnaire (afin d'atteindre un $y_{\max} \approx 9 \log_{10} \text{UFC.ml}^{-1}$).

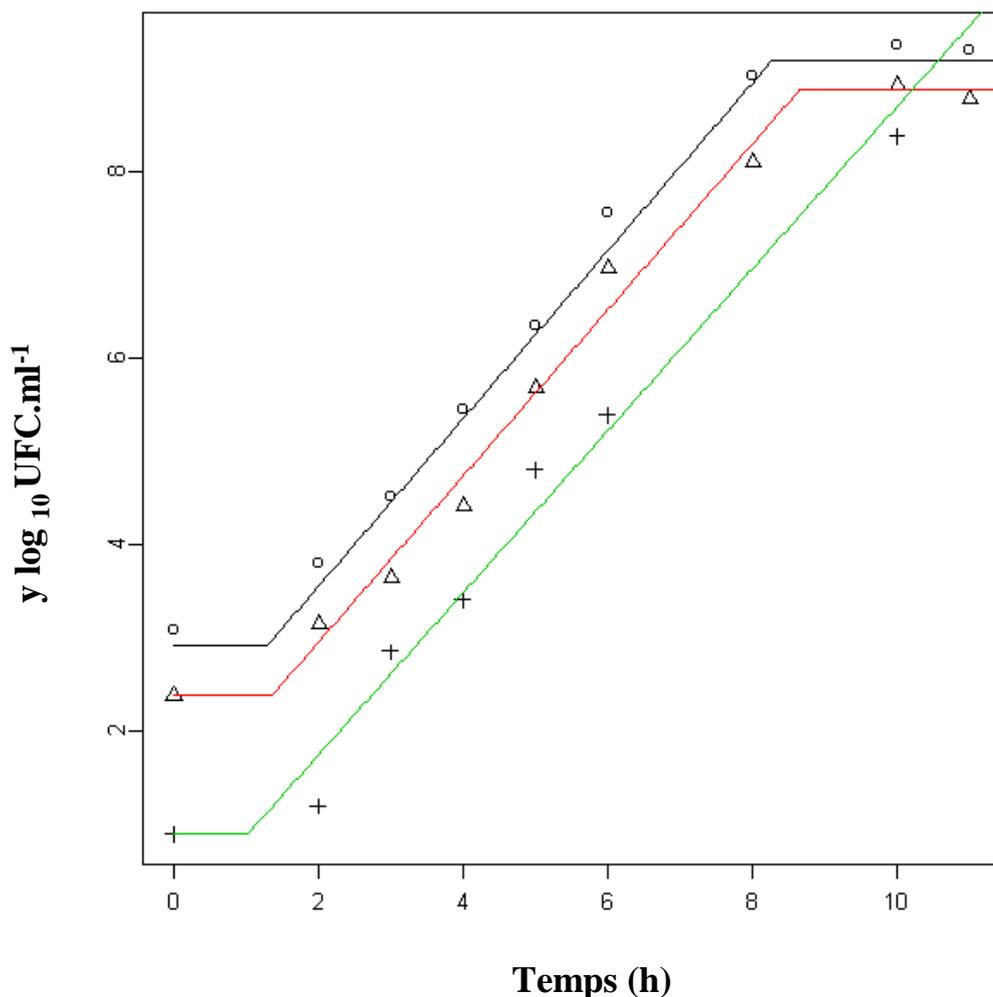


Figure 26 : Cinétique de croissance de *E. coli* O157 dans les 3 types de puits. ○ : puits de $2,25\mu\text{l}$; Δ : puits de $22,5\mu\text{l}$; + : puits de $225\mu\text{l}$.

5.3 Conclusion

Cette étude n'a mis en évidence aucune différence de croissance entre les 3 types de puits, et ce, pour une quantité identique ou différente en *E. coli* O157 dans les 3 types de puits. Ainsi, une cellule de *E. coli* O157 croît aussi bien dans un grand, moyen ou petit puits, ce qui n'induit aucun effet « gravité » ni « forme du puits » sur la croissance de *E. coli* O157. Le taux spécifique de croissance dans les 3 types de puits se situe entre 1,7 et 2h⁻¹ avec une phase de latence comprise entre 1h et 1,3h.

6. Conclusion générale

L'étude du suivi du temps d'apparition de la fluorescence a mis en évidence la meilleure performance des petits puits positifs par rapport au puits positifs de 22,5 et 225 µl. En souche pure, les médianes du temps d'apparition de la fluorescence des puits de 2,25 ; 22,5 et 225 sont respectivement égales à 7,7 ; 9,2 et 12,1 heures avec un écart interquartile (i.e. quartile 75% - quartile 25%) égal respectivement à 1 h, 1,2 h et 1,1 h.

L'inoculum initial en *E. coli* O157, lors de l'étude du suivi du temps d'apparition de la fluorescence en souche pure, était d'environ 700 UFC.ml⁻¹, 70 UFC.ml⁻¹ et 7 UFC.ml⁻¹, respectivement dans les petits, moyens et grands puits. On peut alors calculer, à l'aide des paramètres de croissance estimés par le modèle 2 ajusté aux données de la figure 26 ($\mu = 1,7$; $\lambda = 1,1$) et des inoculums initiaux (y_0) associés à chaque type de puits, le niveau (en UFC.ml⁻¹) atteint par *E. coli* O157 lorsque la fluorescence apparaît dans chaque type de puits. Les tableaux XXI-XXII-XXIII donnent pour chaque type de puits la concentration en *E. coli* O157 atteinte d'une part au moment où 25%, 50%, 75% des puits (supposés positifs) flashent.

Nombre de puits positifs	Temps d'apparition de la fluorescence (heures)	Concentration en <i>E. coli</i> O157 (log ₁₀ UFC.ml ⁻¹)
25%	7,2	7,3
50% (médiane)	7,7	7,7
75%	8,2	8,1

Tableau XXI : Concentration en *E. coli* O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 2,25 µl flashent.

Nombre de puits positifs	Temps d'apparition de la fluorescence (heures)	Concentration en <i>E. coli</i> O157 (\log_{10} UFC.ml ⁻¹)
25%	8,6	7,4
50%	9,2	7,8
75%	9,8	8,3

Tableau XXII : Concentration en *E. coli* O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 22,5 µl flashent.

Nombre de puits positifs	Temps d'apparition de la fluorescence (heures)	Concentration en <i>E. coli</i> O157 (\log_{10} UFC.ml ⁻¹)
25%	11,5	8,5
50%	12,1	8,8
75%	12,6	9,3

Tableau XXIII : Concentration en *E. coli* O157 atteinte lorsque 25, 50 et 75% des puits de 225 µl flashent.

D'après ces résultats (Tableaux XXI-XXII-XXIII), la concentration seuil en *E. coli* pour qu'il y ait apparition de la fluorescence semble se situer aux environs de 8 \log_{10} UFC.ml⁻¹. Il convient toutefois de noter que la concentration en *E. coli* O157 atteinte dans les grands puits au moment de la fluorescence serait plus élevée (8.5-9.3 \log_{10} UFC.ml⁻¹) que celle atteinte dans les moyens et petits puits. Cette différence peut être liée au manque de robustesse de ces résultats (étant donné le faible nombre de données disponibles lors de cette étude en souche pure) ou à une différence d'induction enzymatique selon la forme du puits (avec une oxygénation potentiellement meilleure dans les petits puits). Néanmoins, on peut estimer que la concentration minimale nécessaire à une apparition de fluorescence se situe vers 8 \log_{10} UFC.ml⁻¹.

Ces derniers résultats (en plus du taux spécifique de croissance identique dans chaque type de puits) montrent que les différences de performance entre les puits, en terme de temps d'apparition de la fluorescence, ne sont donc pas liées à des taux de croissance différents et spécifiques à chaque type de puits, mais bien à un effet volume (i.e. une dilution du substrat dégradé qui est supérieure manifestement dans les moyens et grands puits pour une même quantité initiale de bactéries dans les 3 types de puits). Dans l'étude du suivi de la fluorescence, pour une même carte (quantité en bactéries différente dans les 3 types de puits

mais concentration identique), les médianes du temps d'apparition de la fluorescence des 3 types de puits étaient en général proches (résultats non exposés) puisque, dans ce cas, il n'y avait pas d'effet volume et, en conséquence, le temps pour atteindre la concentration minimale nécessaire à une apparition de fluorescence ($8-9 \log_{10} \text{ UFC.ml}^{-1}$) était quasi identique.

Les hypothèses d'effet « de la gravité » et « de la forme des puits » sont également infirmées puisque le taux spécifique de croissance d'une cellule de *E. coli* O157 évoluant dans un petit, moyen ou grand puits est identique.

En outre, pour un même type de puits, le temps d'apparition de la fluorescence est augmenté lorsque le ratio EC/*Salmonella* diminue. Comment expliquer cet effet ratio ? D'une manière générale, étant donné le substrat spécifique à *E. coli*, il n'y a pas de compétition au niveau de la disponibilité du substrat et, en conséquence, la croissance de *E. coli* n'est pas stoppée par la MAMT. La phase stationnaire ($8-9 \log_{10} \text{ UFC.ml}^{-1}$) est donc toujours atteinte (sinon, en présence de flore annexe, de nombreux petits puits positifs ne seraient jamais détectés !). La présence de bactéries environnantes (*Salmonella* dans notre étude), en terme de compétition par rapport au substrat, n'influerait donc pas le taux spécifique de croissance de *E. coli* dans les puits. D'autres formes de compétition (ayant une influence sur le taux spécifique de croissance) peuvent alors être envisagées pour expliquer ce décalage du temps d'apparition de la fluorescence, lorsque le ratio diminue.

Le décalage du temps d'apparition de la fluorescence en fonction du ratio peut également ne pas être reliée à la croissance mais simplement à un « effet bruit de fond » de la MAMT qui, lorsqu'elle est en grande quantité, perturbe l'émission de la fluorescence.

Compte tenu des niveaux de contamination en *E. coli* O157:H7 dans les aliments et des résultats obtenus pour les 3 types de puits en terme de temps d'apparition de fluorescence (14h : temps le plus long observé dans les grands puits pour un ratio de 1/2000), la carte TEMPO actuelle constitue un concept qui pourrait d'ores et déjà être très compétitif compte tenu des autres méthodes qui existent actuellement (voir partie 7).

Il est important de souligner que cette étude était d'ordre exploratoire (peu de répétition, peu de souche utilisée) et que ces résultats mériteraient d'être confirmés en utilisant un plus grand nombre de souches et en effectuant plusieurs répétitions.

7. Bilan pour la conception de la carte de détection de *E. coli* O157:H7

7.1 Rappel

7.1.1 Niveaux de contamination

Le tableau XXIV présente les niveaux de contamination moyens en MAMT et *E. coli* O157:H7 (données industries) dans trois produits appartenant aux trois filières visées dans un premier temps par le kit de détection. Le rappel de ces données révèle toute son importance, pour la suite de ce bilan consacré à l'évaluation des performances de plusieurs cartes envisagées pour la conception du kit.

Matrice / Flore	MAMT (UFC.g ⁻¹)	<i>E. coli</i> O157:H7 (UFC.g ⁻¹)
Lait cru	1000 à 100 000	5-10
Steak	10 000 à 100 000	5-10
Carcasses	100 à 5000	5-10

Tableau XXIV : Niveaux de contamination en MAMT et *E. coli* O157:H7 (UFC.g⁻¹).

7.1.2 Effet répartition (ou ratio en présence de microflores annexes) des bactéries dans la carte

Comme l'ont montré les résultats dans la Partie 3, il existe un effet ratio dans le cas de la détection par fluorescence. Lorsque la concentration incorporée dans la carte est faible (cas de *E. coli* O157:H7), il apparaît alors une variabilité importante de la répartition des bactéries dans les puits considérés (Figure 17). Il a été tenté d'observer expérimentalement cette variabilité en prélevant le contenu de chaque puits (dans les 3 types de puits), mais le faible nombre de données n'a pas permis d'établir une conclusion probante d'un point de vue statistique (ces résultats ne sont donc pas intégrés dans ce bilan). Néanmoins, l'hypothèse du ratio a été validée par l'étude du suivi d'apparition de la fluorescence et, quel que soit le type de puits considéré, un effet répartition et/ou ratio est présent si la concentration initiale de la bactérie recherchée est faible. On peut donc (en plus de la carte TEMPO (CARTE N°4)) aisément imaginer a priori une carte composée uniquement de puits de 2,25 ou de 22,5 ou bien même de 225 µl et évaluer alors les performances de chacune en terme de rapidité de détection et de sensibilité.

7.1.3 Limites de détection

Imaginons, par exemple, trois types de cartes composées comme suit et basées sur le principe de révélation par fluorescence (Tableau XXV):

	CARTE N°1	CARTE N°2	CARTE N°3	CARTE N°4
Volume des puits (µl)	225	22,5	2,25	2,25/22,5/225
Nombre de puits	25	135	890	3 x 16
Volume incorporé dans la carte (ml)	5.5	3	2	4

Tableau XXV : Caractéristiques relatives aux 4 cartes imaginées.

On peut alors ensuite calculer les limites théoriques de détection associées à chaque carte de la façon suivante :

Pour un nombre théorique moyen (m) de cellules bactériennes dans la carte, la probabilité $P_{(x>1)}$ qu'au moins une cellule soit réellement introduite dans la carte est définie par une loi de *Poisson* : $P_{(x>1)} = 1 - P_{(x=0)} = 1 - e^{-m}$

Les limites de détection, en nombre moyen par carte (m_{seuil}) associée à une probabilité de détection P_{seuil} (fixée), sont égales à : $m_{\text{seuil}} = \ln(1/(1 - P_{\text{seuil}}))$.

Pour une carte de volume v , la concentration seuil à incorporer dans la carte est alors égale à :

$$C_{\text{seuil}} = m_{\text{seuil}} / [(v * \text{facteur de dilution})]$$

En considérant les dilutions nécessaires (avant introduction de l'échantillon dans la carte) pour chaque matrice, les limites de détection (en UFC.ml⁻¹) des différentes cartes (calculées à $P_{\text{seuil}} = 95\%$) sont les suivantes (Tableau XXVI) :

Facteur de dilution	CARTE N°1	CARTE N°2	CARTE N°3	CARTE N°4
Aucun	0,5	1	1,5	0,75
1/5	2,5	5	7,5	3,75
1/10	5	10	15	7,5
1/40	20	40	60	30

Tableau XXVI : Limites de détection en UFC.ml⁻¹.

7.2 Choix du type de puits pour la carte de détection de *E. coli* O157:H7

Si on considère d'une part, que, pour être détecté (apparition de fluorescence), un puits doit afficher une concentration de $8 \log_{10}$ UFC.ml⁻¹ (d'après les résultats résumés en partie 5) et que, d'autre part, au moins une cellule doit être présente dans un puits pour qu'il y ait apparition de fluorescence, on peut à l'aide des paramètres de croissance de *E. coli* O157 estimés (en souche pure) par le modèle 2 (Figure 25) calculer le temps de détection théorique associé à chaque carte qui coïncide avec la positivité du test (i.e. apparition de fluorescence dans au moins un puits) :

CARTE	Concentration initiale par puits (y_0 en \log_{10} UFC.ml ⁻¹)	Temps de détection (heures)
CARTE N°1 (225µl)	0,6	11
CARTE N°2 (22,5µl)	1,6	9,7
CARTE N°3 (2,25µl)	2,6	8,4
CARTE N°4 (3 types de puits)	2,6/1,6/0,6	8,4 ou 9,7 ou 11*

* La cellule de *E. coli* O157:H7 peut se retrouver dans un des trois types de puits, même si la probabilité qu'elle se retrouve dans un grand puits est plus élevée.

Tableau XXVII : Temps de détection des 3 cartes en fonction de la concentration initiale.

Le tableau XXVII montre que les cartes composées par des puits de 2,25 ; 22.5 et 225 µl sont positives respectivement à partir de 8,4 ; 9,7 et 11 heures.

Si on considère la sensibilité et le temps de détection de chacune des cartes, on peut établir deux classements de celles-ci en fonction de leurs performances respectives, en terme de sensibilité et de rapidité de détection :

❶ Sensibilité (limite de détection)

Rang	Carte
N°1	CARTE N°1
N°2	CARTE N°4
N°3	CARTE N°2
N°4	CARTE N°3

Tableau XXVIII : Classement des cartes en fonction de la sensibilité.

② Temps d'apparition de la fluorescence dans au moins un des puits de la carte

Rang	Carte
N°1	CARTE N°3
N°2	CARTE N°2
N°3	CARTE N°1
ND	CARTE N°4

Tableau XXIX : Classement des cartes en fonction de la rapidité de détection.

Les cartes les plus performantes, en terme de sensibilité et de rapidité de détection, sont respectivement les cartes N°1 et N°3 (Figure 27). Un compromis devra être trouvé pour satisfaire à la fois aux contraintes de sensibilité de la carte et de rapidité de détection afin d'optimiser ce kit de détection pour *E. coli* O157 :H7.

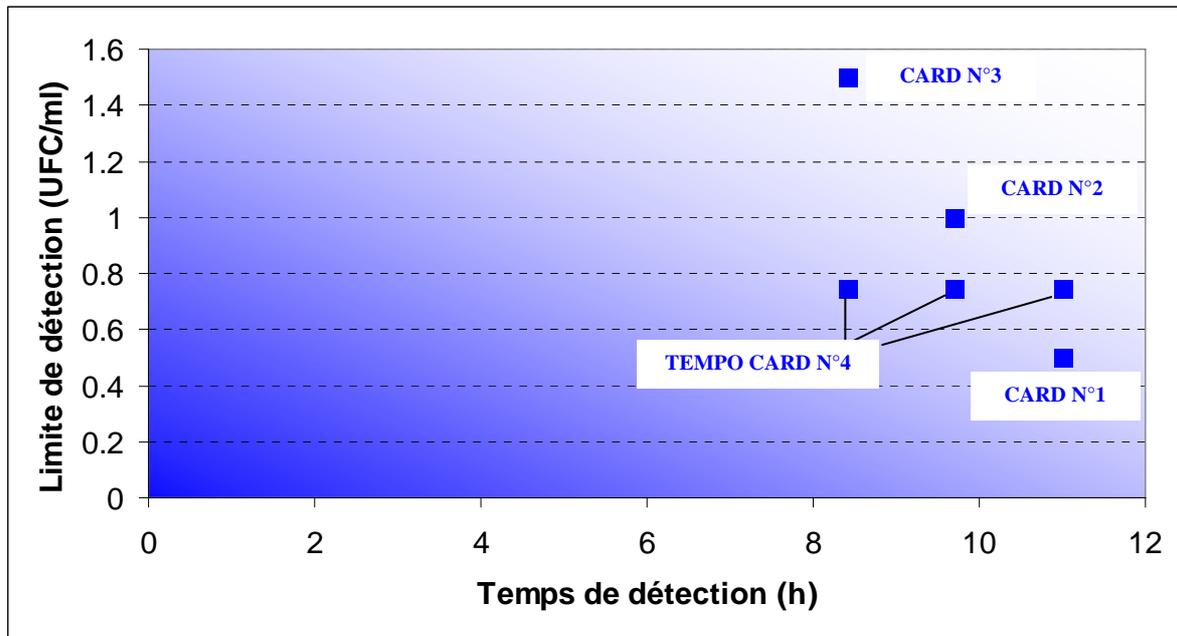


Figure 27 : Projection des cartes en fonction de la sensibilité (limite de détection) et du temps de détection.

La carte TEMPO actuelle présente une sensibilité proche de la carte N°1 et des temps de détection qui peuvent être équivalents à ceux déterminés pour les 3 autres cartes (si l'on fait l'hypothèse qu'une cellule, même avec une faible probabilité, peut se retrouver dans un petit puits) et semble alors très compétitive.

Néanmoins, les résultats obtenus en terme de temps de détection pour chacune des différentes cartes imaginées font référence au principe de détection par fluorescence dans les puits et ont

été déterminés à partir d'échantillons en milieu limpide (vs matrices alimentaires). Ainsi, ces mêmes résultats seront peut-être différents lorsque le principe de détection (en cours de détermination, **CONFIDENTIEL**) pour *E. coli* O157:H7 sera appliqué pour ces mêmes cartes.

Toutefois, si les résultats des expérimentations qui devront être menées avec le principe de détection pour *E. coli* O157:H7 tendent à se rapprocher de ceux déterminés en révélation par fluorescence, la carte TEMPO actuelle présenterait alors de nombreux avantages : une sensibilité compétitive grâce au volume important introduit dans la carte, une rapidité de détection intéressante (11 heures au maximum en souche pure) et également d'un point de vue conception, un coût et temps de fabrication réduit, étant donné le moule déjà existant.

Ainsi, si on prend un scénario basé sur le fonctionnement d'un abattoir : l'abattage des bovins se déroule le plus souvent de 4h00 à 11h00 puis les carcasses se dirigent en premier lieu vers les salles de ressuyage avant d'être ensuite stockées en salle de réfrigération (pour une maturation courte et une destination le lendemain matin (5h00) vers les ateliers de transformation). Ainsi, lors de l'abattage, les opérateurs effectueraient des excisions de la carcasse à différents endroits et l'analyse des échantillons débiterait au plus tard à 12h00. Les résultats seraient donc connus pour le lendemain matin (5h00) et le responsable qualité aurait ainsi libre choix dans la destination de ses carcasses (test négatif : transfert vers les ateliers de steak haché, test positif : transfert vers les ateliers de découpe pour viande non transformée ou assainissement des carcasses (acides faibles encore non autorisés en UE).

En ouverture, deux stratégies de pré-enrichissement pourraient être proposées dans le but d'abaisser les limites de détection de la carte choisie et ainsi d'augmenter la sensibilité du test. La première serait de pooler les différents échantillons issus de l'excision de différents sites de 10 carcasses, ce qui augmenterait la quantité potentielle de *E. coli* O157:H7 à analyser. La deuxième consisterait à réaliser un pré-enrichissement en sac (25g d'échantillon dans 225ml de milieu d'enrichissement) comme suit pour abaisser la limite de détection de *E. coli* O157:H7.

Prenons le cas de la carte N°3 qui, en présence d'un facteur de dilution au $1/40^{\text{ème}}$, présente une limite de détection égale à $C_{\text{seuil}} = 60 \text{ UFC.ml}^{-1}$ qui s'avère peu satisfaisante compte tenu, par exemple, du niveau moyen en *E. coli* O157:H7 dans le steak haché ($\sim 8 \text{ UFC.g}^{-1}$) (Crowley et al., 2005).

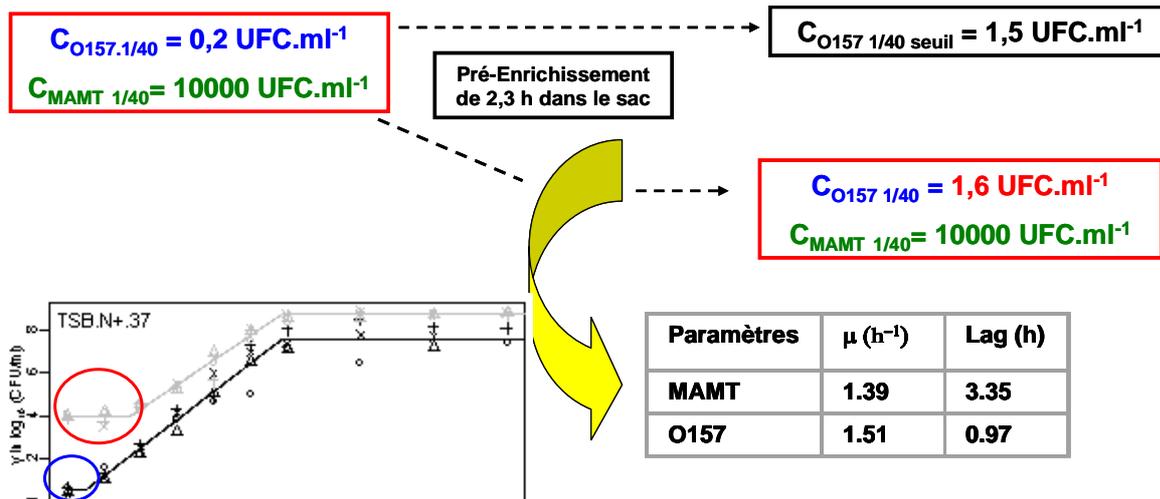


Figure 28 : Stratégie de pré-enrichissement.

D'après des études réalisées précédemment au laboratoire dans le milieu TSB avec novobiocine à 37°C et après 2h20 de pré-enrichissement (Figure 28), le niveau en *E. coli* O157:H7 passerait d'une concentration de 0,2 (8 UFC.ml⁻¹* 1/40) à une concentration estimée (avec les paramètres de croissance de la Figure 28) de 1,6 UFC.ml⁻¹ et deviendrait alors supérieur à la limite de détection ($C_{O157 1/40 \text{ seuil}} = 1,5 \text{ UFC.ml}^{-1}$) de la carte composée de 890 petits puits. Qui plus est, avec le milieu d'enrichissement choisi ci-dessus (TSB+novobiocine à 37°C), le niveau en flore totale n'augmenterait pas, étant donné le temps de latence égal à 3,35h pour la MAMT. Néanmoins, ce temps de latence est variable selon les protocoles d'enrichissement utilisés et le choix du protocole aura donc toute son importance dans cette stratégie. Les résultats de la Partie 3 avaient, en effet, montré la présence d'une phase de latence nulle pour la MAMT avec les milieux TEMPO EC et TSB, utilisés sans antibiotique ! De plus, comme évoqué dans le Chapitre 2 de ce mémoire expérimental, l'action de la novobiocine peut également désavantager la croissance de certaines souches de *E. coli* O157:H7.

Avec ces deux stratégies, la carte N°3 (composée de puits de 2,25 μ l) devient alors la plus compétitive puisqu'elle allie, à la fois, une sensibilité (avec des limites de détection acceptables, compte tenu des niveaux faibles de contamination en *E. coli* O157:H7) et une rapidité de détection (~10 heures) intéressantes.

Toutes les expérimentations menées dans le cadre de ce projet TEMP'O157 ont permis de mieux comprendre les phénomènes observés (i.e. apparition « précoce » de la fluorescence dans les petits puits). Les résultats obtenus permettent aussi de prévoir, à l'aide des simulations, les performances de nouvelles cartes non encore élaborées.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES...



C

Cette dernière partie est consacrée à la discussion des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, ainsi qu'aux perspectives de recherche pouvant y faire suite. Cette partie se décline en quatre sous-parties.

1. Optimisation de la phase d'enrichissement

Les expérimentations menées au cours de cette 1^{ère} étape ont mis en évidence, lors de l'enrichissement d'échantillons de steak haché contaminés, un arrêt de la croissance des souches de *E. coli* O157:H7 lorsque la flore annexe atteint sa densité maximale (effet Jameson). Il convient de noter que cette étude a été réalisée avec un seul type de steak haché (15% de MG et conditionné sous atmosphère protectrice) et uniquement quatre souches de *E. coli* O157:H7, non stressées.

Il serait donc intéressant de confirmer les résultats obtenus et de valider le modèle de prédiction établi, en utilisant un plus grand nombre de souches de STEC (de sérotypes O157:H7 et non-O157:H7) et d'autres produits. De plus, ces mêmes souches devront dans un second temps être stressées afin d'appréhender les éventuelles différences obtenues en terme de croissance. En effet, Whiting et Bagi (2002) ont montré que des cellules bactériennes de *Listeria monocytogenes* en phase exponentielle avaient un temps de latence plus faible que des cellules cultivées dans des conditions défavorables. D'autre part, Augustin et al. (2000) ont montré que ce même temps de latence augmente lorsque la taille de l'inoculum est faible. Différents niveaux d'inoculum devront donc être également étudiés.

Enfin, plusieurs types de steaks hachés (différents % de MG, différentes conditions d'emballage) devront, en outre, être utilisés pour mener à bien ces expérimentations complémentaires. En effet, dans le cas d'emballages sous vide ou sous atmosphère modifiée, le steak haché peut contenir des flores annexes prédominantes différentes, impliquant alors d'autres types d'interaction avec *E. coli* O157:H7 (e.g production d'acides ou de bactériocines par la flore lactique dominante lorsque le steak haché est emballé sous vide).

Nous avons également mis en évidence une interaction de type compétition simple entre les souches de STEC non-O157:H7 testées et la flore annexe de fèces de bovins. D'autre part, il a été montré que le milieu EC sans novobiocine semble plus performant pour la recherche des

STEC dans les fèces de bovins. Des investigations complémentaires, analogues à celles évoquées pour le steak haché, devront également être menées pour appuyer les résultats observés et l'authenticité des prédictions obtenues avec le modèle de croissance par compétition. Des screenings par méthodes génétique et immunologique pourraient aussi être réalisés périodiquement au cours de l'enrichissement pour confirmer, d'une part, l'apparente supériorité du milieu EC et, d'autre part, l'obtention probable de résultats faussement négatifs après enrichissement avec un milieu non sélectif (e.g TSB ou EPT).

Dans le cas de la matrice « lait cru », nous avons vu que le seul effet Jameson ne suffit pas à expliquer l'arrêt de la croissance de *E. coli* O157:H7 et que d'autres types d'interaction entre les deux flores semblent intervenir. Aussi, la modélisation par compétition simple des cinétiques de croissance s'est révélée inadaptée. D'autre part, l'utilisation de modèles plus récents (Van Impe et al., 2005 ; Poshet et al., 2005) prenant en compte d'autres types d'interactions s'est avérée impossible, étant donné les données recueillies.

Ainsi, les perspectives de travail envisagées pour finaliser la caractérisation de la croissance des STEC lors de l'enrichissement d'échantillons de lait cru consisteraient à mesurer, en parallèle des suivis de croissance des STEC et de la flore annexe du lait, les valeurs de pH, la production de bactériocines ou d'autres composés antimicrobiens.

Enfin, l'étude sur les interférences liées à la présence d'agents sélectifs dans les milieux d'enrichissement a révélé que la novobiocine entraîne un ralentissement, voire une inhibition de la croissance de certaines souches de STEC. L'ajout de novobiocine dans le milieu d'enrichissement peut, par conséquent, impliquer l'obtention de résultats faussement négatifs. Cette étude met également en évidence une sensibilité des souches de STEC non-O157:H7 vis-à-vis de l'acriflavine.

Une première perspective de travail serait alors d'effectuer une étude complète et analogue à celle réalisée pour la novobiocine afin d'évaluer l'impact de différentes concentrations d'acriflavine sur la croissance de divers sérotypes de STEC.

Il serait intéressant, d'autre part, d'étudier les effets d'autres agents sélectifs sur la croissance de différents sérotypes de STEC mais également sur la croissance de diverses flores annexes. En effet, Szabo et al. (1986) ont montré, par exemple, qu'une concentration trop élevée en sels biliaires pouvait inhiber la croissance des STEC. Les agents sélectifs entraînant potentiellement un ralentissement ou une inhibition de la croissance de certaines souches de

STEC seraient alors clairement identifiés. L'éviction de ces agents sélectifs de la composition de certains milieux d'enrichissement ou l'ajustement de leur concentration pourraient ainsi être définitivement arrêtés.

D'autre part, l'évaluation précise de l'action d'un certain nombre d'agents sélectifs à l'encontre de plusieurs flores annexes pendant l'enrichissement permettrait à l'avenir de choisir judicieusement l'agent à ajouter en fonction du type de matrice (et donc de sa flore annexe spécifique) analysée, ce qui n'est pas le cas actuellement (cf. Publication N°1).

Cette investigation concernerait les agents sélectifs qui sont actuellement ajoutés dans les milieux d'enrichissement pour la recherche des STEC, à savoir les sels biliaries, le cefixime, le potassium de tellurite, la vancomycine et la cefsulodine.

2. Optimisation de la maîtrise du danger « STEC » dans la filière « viande hachée »

Les expérimentations menées sur l'optimisation de l'échantillonnage au niveau de l'usine de fabrication du haché ont conduit à l'élaboration de protocoles permettant aux industriels d'assurer une meilleure innocuité de leur produit.

Une approche complémentaire aux prélèvements effectués sur les lots de steaks hachés a également été proposée dans le but de maîtriser encore davantage le « danger STEC » dans la viande hachée (cf. Chapitre 3 du Mémoire Expérimental). Cette stratégie qui consiste à échantillonner les carcasses de bovins dès la fin de l'abattage est potentiellement efficace pour réduire les contaminations en aval dans les lots de steaks hachés mais reste néanmoins coûteuse en terme de temps et d'argent pour l'industriel. D'autre part, son application dans le cas où l'abattoir est contigu à l'usine de production du haché s'avère quelque peu limitée, étant donné l'incorporation de viande foraine (i.e. carcasses ou quartiers avant exogènes à l'abattoir) dans la fabrication du steak haché.

Ainsi, une autre stratégie moins onéreuse pourrait être envisagée de façon à échantillonner l'ensemble de la matière première destinée à la fabrication de haché. Cette approche complémentaire et pertinente pour la maîtrise de *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée est basée sur le contrôle des minerais. Elle permet, en effet, dans le cadre d'autocontrôles, de vérifier la totalité de la matière première (viandes endogènes à l'abattoir et viandes foraines) entrant dans l'atelier de fabrication.

Comme évoquée dans le mémoire bibliographique, une des approches les plus communément utilisées aux Etats-Unis consiste à subdiviser 20 tonnes de minerais en 4 sous-lots de 5 tonnes chacun. Cinq prélèvements de 75 g chacun sont réalisés dans chacun des sous lots. Les échantillons regroupés et homogénéisés de 375 g sont ensuite analysés. Ainsi, quatre analyses portant sur une masse totale de 1500 g sont réalisées pour qualifier le lot de 20 tonnes de minerais. En outre, concernant les modalités pratiques de réalisation des prélèvements de minerais, deux possibilités existent et sont dictées par l'état du minerai (frais ou congelé). En effet, un minerai congelé rend difficile la réalisation d'excisions de surface du tissu conjonctif sous-cutané et il faut recourir à des appareils de type emporte pièces pour réaliser ces carottages comprenant tissus superficiels et profonds. Dans ce cas de figure, 375 g de minerais correspondraient à environ 200 cm² de tissu à la superficie des morceaux de muscles. Lorsque le minerai est réfrigéré, les excisions de surface sont possibles et 375 g correspondraient à 60 prélèvements de 15 cm² chacun avec une surface totale excisée de 900 cm² (la contamination des viandes étant superficielle, on peut en déduire que la probabilité de détecter le pathogène est plus importante lorsque les excisions superficielles sont réalisées).

Néanmoins, cette nouvelle approche concernant l'échantillonnage des minerais exige une validation scientifique. En effet, la stratégie de « pooling » (échantillons composites de 375g) nécessite d'avoir vérifié au préalable la limite de détection de la méthode, or à notre connaissance, aucune étude publiée ne permet de s'assurer de la détection de 1 cellule de *E. coli* O157:H7 dans 375 g de minerais. En effet, les résultats de notre étude réalisée sur la matrice « steak haché » (cf. Chapitre 3 du Mémoire Expérimental et Publication N°5) ne sont pas extrapolables aux minerais (la microflore totale étant supérieure à la surface des morceaux de muscles des minerais). Il sera donc nécessaire, suite à ce premier travail mené sur le steak haché, d'effectuer des expérimentations similaires et complémentaires sur cette nouvelle matrice « minerais excisés », afin de s'assurer de la détection de 1 cellule de *E. coli* O157:H7 dans 375 g de minerais.

D'autre part, en l'absence totale de données chiffrées sur la contamination des minerais en France par *E. coli* O157:H7, il nous est impossible de dire si ce plan d'échantillonnage conçu selon l'approche américaine est pertinent et adapté aux industries françaises. Une étude de prévalence sur la contamination des minerais par *E. coli* O157:H7 devra donc être menée afin d'infirmer ou de confirmer la pertinence de la stratégie proposée ci-dessus. Compte tenu de

l'émergence d'autres sérotypes, il serait également judicieux d'étendre ces perspectives de travail à l'ensemble des STEC.

3. Gestion du risque en cas de contamination

Les résultats obtenus lors de notre étude concernant l'optimisation de l'échantillonnage de la viande hachée ont pu apporter des informations essentielles dans la perspective de mettre en place des protocoles permettant de quantifier la contamination des viandes hachées. En effet, l'AFSSA a été saisie par la DGAL d'une demande d'appui scientifique et technique relative à l'évaluation de la contamination par *Escherichia coli* O157:H7 dans la filière de production des viandes hachées. Cette demande fait suite au réel besoin manifesté par les industriels quant à la gestion du danger *E. coli* O157:H7 en cas de contamination d'un ou plusieurs lots de steaks hachés. La Saisine N°2006-SA-0282 de l'AFSSA relate dans le détail les éléments de réponse apportés sur cette question à partir de l'expertise acquise par notre unité, notamment dans le cadre de cette thèse. Un résumé des modalités d'échantillonnage proposées dans cette saisine figure ci-dessous.

En cas de résultat d'autocontrôle positif sur une mêlée, le professionnel serait amené en premier lieu à évaluer le niveau de contamination de cette mêlée démontrée comme contaminée. L'objectif de ces contrôles complémentaires serait de pouvoir, le cas échéant, éliminer l'hypothèse d'une contamination à un niveau très élevé pouvant causer une épidémie.

Plusieurs cas se présentent :

- ➔ Si tous les échantillons prélevés sur cette mêlée se révèlent positifs, cette hypothèse de contamination à un niveau très élevé ne pourra pas être éliminée. Dans ce cas de figure, l'industriel devra mettre en œuvre des contrôles visant à déterminer l'étendue de la contamination des produits avec des investigations sur les matières premières dont est issue la mêlée contaminée. Il s'agira également de contrôler les mêlées fabriquées pendant d'autres journées et qui sont issues, au moins pour partie, des minerais suspects.

- ➔ Si des échantillons analysés issus de la mêlée contaminée donnent des résultats négatifs (pas de détection de *E. coli* O157:H7 pathogène), les deux mêlées, situées chronologiquement

avant et après la mûlée contaminée, devront faire l'objet du même plan d'échantillonnage que la mûlée contaminée.

L'objectif du contrôle de la mûlée en amont de celle contaminée est de vérifier si l'apport du minerai contaminé a pu se faire en amont. Si cette mûlée « amont » est contaminée (au moins un échantillon positif), il faudra continuer les investigations sur les mûlées précédentes jusqu'à ne plus trouver aucun d'échantillon positif, en utilisant pour chaque mûlée objet du contrôle renforcé le même plan d'échantillonnage que celui utilisé pour la mûlée contaminée lors de l'autocontrôle.

➔ Si dans cette cascade de contrôles renforcés en amont de la production de la mûlée détectée contaminée, tous les échantillons analysés d'une mûlée étaient positifs, on se retrouverait dans le premier cas évoqué ci-dessus exigeant des investigations lourdes incluant la matière première et éventuellement des mûlées fabriquées pendant d'autres journées. En ce qui concerne la mûlée suivante, il s'agira de vérifier qu'elle n'a pas été contaminée par la mûlée détectée positive par l'intermédiaire du hachoir. Si cette mûlée suivante s'avère elle aussi contaminée, il conviendra d'appliquer aussi le plan d'échantillonnage à la mûlée suivante et ainsi de suite en aval jusqu'à aboutir à une mûlée ne donnant aucun échantillon positif ou jusqu'au prochain nettoyage du hachoir.

Le plan d'échantillonnage mis en place sur chaque mûlée devra être suffisamment important en nombre de prélèvements afin :

- ❶ de permettre de détecter de faibles niveaux de contamination et ;
- ❷ de permettre d'estimer, par la méthode du nombre de plus probable, le niveau de contamination dans une gamme suffisamment large de concentrations.

Si l'on privilégie le premier objectif, il semble raisonnable de choisir un plan d'échantillonnage sans dilution. L'utilisation de dilutions aurait, pour seul avantage, de permettre la quantification de plus forts niveaux de contamination, ce qui n'apparaît pas comme prioritaire face au premier objectif.

Considérons un plan d'échantillonnage consistant i) à prélever n échantillons de masse m (en grammes) dans chaque mûlée investiguée et ii) à analyser chaque échantillon indépendamment. L'estimation de la concentration la plus probable dans la mûlée ne peut être réalisée que si l'on peut supposer la répartition de la contamination homogène dans la mûlée. Cette hypothèse est tout à fait recevable compte tenu des temps de pré-hachage et hachage opérés (Reinders et al., 2003).

Dans ce cas de répartition homogène du pathogène dans la viande hachée, la distribution du nombre de cellules du pathogène dans la masse m est décrite par une loi de Poisson de moyenne $C \times m$, C représente la concentration dans la mûlée en cellules par gramme. A partir de cette loi, on peut calculer la probabilité p_- qu'un échantillon soit négatif : $p_- = \exp(-C \times m)$. Si on obtient un nombre k d'échantillons positifs compris entre 1 et $n - 1$, on peut estimer simplement la concentration la plus probable par $\hat{C} = -\ln(1 - k/n)/m$.

Le tableau XXX donne ainsi les estimations, par la méthode du nombre le plus probable, de la concentration dans une mûlée à partir de l'analyse de 30 échantillons de 25 grammes chacun. Le 1^{er} échantillon analysé (celui ayant servi à identifier la mûlée positive) doit être considéré comme 1 des 30 échantillons de sa mûlée. Pour $n = 30$ et $m = 25\text{g}$, on voit dans le tableau XXX qu'un tel plan d'échantillonnage permet de quantifier la concentration dans la mûlée dans une gamme allant environ de 0,001 à 0,1 cellule par gramme.

On peut, qui plus est, substituer à ce plan d'échantillonnage qui peut être lourd en terme de temps et d'argent pour l'industriel, un protocole allégé d'analyses visant à prendre également 30 échantillons de 25 g chacun puis à regrouper (i.e. pooler) par 3 les échantillons de 25 g pour constituer des échantillons composites de 75 g soumis à l'analyse. On réduit ainsi par trois le nombre d'analyses sans porter atteinte à l'exactitude des résultats puisque la limite de détection de l'analyse est identique (cf. Chapitre 3 du Mémoire Expérimental et Publication N°5). La gamme des niveaux quantifiables est néanmoins diminuée (Tableaux XXXI).

Nb d'échantillons positifs (k)	0	1	3	5	7	11	15	19	23	25	27	29	30
Concentration estimée en cellules par gramme (C)	NC*	0,001	0,004	0,007	0,011	0,018	0,028	0,040	0,058	0,072	0,092	0,136	NC

* NC : non calculable

Tableau XXX : Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une m \acute{e} lée \grave{a} partir de l'analyse de 30 \acute{e} chantillons de 25 grammes chacun.

Nb d'échantillons positifs (k)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration estimée en cellules par gramme (C)	NC	0,001	0,003	0,005	0,007	0,009	0,012	0,016	0,021	0,031	NC

* NC : non calculable

Tableau XXXI : Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une m \acute{e} lée \grave{a} partir de l'analyse de 10 \acute{e} chantillons de 75 grammes chacun.

Il est important toutefois de garder en t \acute{e} te l'incertitude li \acute{e} e \grave{a} cette estimation et \grave{a} une classification \grave{a} partir du nombre d' \acute{e} chantillons positifs. Si on nomme X le nombre d' \acute{e} chantillons positifs parmi les n analys \acute{e} s, on peut calculer, pour une concentration C donn \acute{e} e dans la m \acute{e} lée, la probabilit \acute{e} associ \acute{e} e \grave{a} chaque valeur possible de X :

$\Pr(X = k) = C_n^k (1 - p_-)^k p_-^{n-k}$. On peut donc aussi calculer la probabilit \acute{e} d'obtenir au moins

k positifs: $\Pr(X \leq k) = \sum_{y=0}^k C_n^y (1 - p_-)^y p_-^{n-y}$. Le tableau XXXII reporte cette derni \acute{e} re

probabilit \acute{e} calcul \acute{e} e pour diverses concentrations C dans la m \acute{e} lée et diverses valeurs possibles de k .

Ainsi, on voit par exemple, dans la premi \acute{e} re colonne, qu'une m \acute{e} lée contamin \acute{e} e \grave{a} 0,01 cellule par gramme n'aura qu'une probabilit \acute{e} de 0,1% de ne pr \acute{e} senter aucun positif sur 30 \acute{e} chantillons alors qu'une m \acute{e} lée contamin \acute{e} e \grave{a} 0,001 cellule par gramme aura une probabilit \acute{e} de 47,2% de ne pr \acute{e} senter aucun positif sur 30 \acute{e} chantillons. Si l'on accepte un risque d'erreur de 5% (risque de se tromper en affirmant que la concentration de la m \acute{e} lée est inf \acute{e} rieure \grave{a} tel seuil), on peut dire qu'une m \acute{e} lée ne pr \acute{e} sentant aucun \acute{e} chantillon positif sur 30 a une concentration inf \acute{e} rieure \grave{a} 0,004 cellule par gramme. De m \acute{e} me, on pourra dire avec un risque d'erreur de 5% qu'une m \acute{e} lée pr \acute{e} sentant 5 positifs sur 30, par exemple, a une concentration inf \acute{e} rieure \grave{a} 0,03 cellule par gramme. Le tableau XXXII permet donc en quelque sorte d'avoir

une borne d'incertitude par excès sur la concentration estimée dans le tableau XXXI, en regardant la valeur de concentration correspondant à la cellule encadrée dans chaque colonne.

C (UFC.g ⁻¹)	k : nombre d'échantillons positifs sur n = 10 échantillons analysés de m = 75 g chacun										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,000	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,900	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,800	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,700	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,600	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,500	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,400	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,300	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,200	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,100	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006	1
0,090	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,012	1
0,080	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,025	1
0,070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,051	1
0,060	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005	0,106	1
0,050	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,022	0,212	1
0,040	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,011	0,086	0,400	1
0,030	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	0,015	0,080	0,285	0,672	1
0,020	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	0,011	0,051	0,165	0,393	0,690	0,920	1
0,010	0,001	0,007	0,038	0,130	0,311	0,553	0,779	0,923	0,983	0,998	1
0,009	0,001	0,012	0,061	0,187	0,400	0,645	0,843	0,951	0,991	0,999	1
0,008	0,002	0,023	0,098	0,264	0,501	0,736	0,897	0,972	0,995	> 0,999	1
0,007	0,005	0,041	0,154	0,361	0,612	0,819	0,939	0,986	0,998	> 0,999	1
0,006	0,011	0,074	0,236	0,480	0,724	0,890	0,968	0,994	0,999	> 0,999	1
0,005	0,024	0,131	0,350	0,615	0,827	0,943	0,986	0,998	> 0,999	> 0,999	1
0,004	0,050	0,224	0,498	0,754	0,911	0,976	0,996	0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,003	0,105	0,371	0,673	0,876	0,966	0,993	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,002	0,223	0,584	0,847	0,961	0,993	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,001	0,472	0,840	0,969	0,996	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tableau XXXII : Calcul, pour diverses concentrations C dans la m \acute{e} lée et diverses valeurs possibles de k, de la probabilit \acute{e} que le nombre X d' \acute{e} chantillons positifs parmi 10 \acute{e} chantillons de 75 grammes soit inf \acute{e} rieur ou \acute{e} gal \acute{a} k. Pour chaque valeur de k appara \acute{i} t encadr \acute{e} e en rouge la cellule contenant la plus grande valeur report \acute{e} e de cette probabilit \acute{e} inf \acute{e} rieure ou \acute{e} gal \acute{a} 5%.

Enfin, il convient de noter que les modalit \acute{e} s d' \acute{e} chantillonnage pr \acute{e} sent \acute{e} es ci-dessus sont cibl \acute{e} es uniquement sur *E. coli* O157:H7. Or, compte tenu de l'actualit \acute{e} , il serait int \acute{e} ressant de mener, avec divers s \acute{e} rotypes de STEC non-O157:H7, un travail semblable \acute{a} celui r \acute{e} alis \acute{e} sur la matrice « steak hach \acute{e} » avec le seul s \acute{e} rotype O157:H7 (cf. Chapitre 3 du M \acute{e} moire Exp \acute{e} rimental et Publication N $^{\circ}$ 5). En effet, ce travail permettrait de s' \acute{a} ssurer de la d \acute{e} tecti

d'une cellule de STEC non-O157:H7 dans 75g (voire 375g) avec une méthode de screening adaptée (e.g. Kit BAX, Qualicon), dans le but d'établir par la suite des plans d'échantillonnage destinés, soit à la recherche du pathogène dans les lots de haché, soit à l'évaluation du niveau de contamination de la production.

4. Méthode de détection et de dénombrement

Cette partie concerne les perspectives de recherche pouvant faire suite aux premières expérimentations menées dans le cadre du projet TEMP'O157:H7[®]. Il convient de rappeler que ce projet a pour vocation de mettre, sur le marché des industries alimentaires, un kit de détection rapide et de dénombrement de *E. coli* O157:H7. Les perspectives de recherche et développement à mener font cependant partie du domaine confidentiel puisqu'elles sont la propriété de la société bioMérieux. Ainsi, seules les grandes lignes de la suite à donner aux premières expérimentations seront abordées.

Dans un premier temps, des expérimentations complémentaires devraient être effectuées prochainement avec le principe de détection retenu pour « la carte O157:H7 », afin d'élaborer définitivement un prototype. Des essais devraient, dans un second temps, être réalisés à partir d'échantillons de matrices alimentaires dans le but de valider ce prototype.

CONCLUSION...

C

Cette étude a permis d'une manière générale d'optimiser les protocoles de recherche de *E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157:H7 dans les aliments et les matières environnementales, dans le but d'améliorer *in fine* la maîtrise du danger constitué par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines.

Notre étude souligne qu'un enrichissement trop court, comme les 6 heures d'incubation dans le cas de l'IMS (ISO EN 16654), peut conduire à l'obtention de résultats faussement négatifs. Il s'avère, néanmoins, inutile dans certaines conditions de prolonger l'étape d'enrichissement car une interaction de type compétition simple (effet Jameson) avec la flore annexe arrête la croissance des STEC. Cet arrêt est plus ou moins rapide selon la matrice analysée et sa densité en flore annexe naturelle (de 4 à 7 h pour les fèces et de 10 à 12 h pour le steak haché dans nos expérimentations). Dans le lait, des interactions plus complexes (comme par exemple la production d'acide par la flore lactique) entraînent un arrêt de la croissance des STEC avant celui de la flore naturelle (8,5 à 11 h dans nos expérimentations).

Il a été montré, qui plus est, que cet arrêt de la croissance des STEC en raison des interactions avec la flore annexe des échantillons testés peut entraîner l'obtention, après détection, de résultats faussement négatifs.

L'utilisation d'agents sélectifs a pour but de freiner la croissance de la flore annexe, ce qui peut avoir pour impact de prolonger la croissance du pathogène cible. Dans le cas de la recherche des STEC à partir d'échantillons de fèces de bovins, notre étude souligne l'intérêt d'utiliser le milieu EC. En effet, la présence de sels biliaires dans le milieu d'enrichissement permet, en ralentissant la croissance de la flore annexe, une meilleure croissance du pathogène, évitant ainsi l'apparition de « faux négatifs ». Il apparaît, en revanche, que l'addition de novobiocine dans le milieu, initialement destinée à inhiber la croissance de la flore annexe, ralentit ou inhibe la croissance de certaines souches de STEC (O157:H7 et non-O157:H7). Nous suggérons ainsi de ne plus supplémenter les milieux d'enrichissement avec cet antibiotique, sous crainte d'obtenir des résultats faussement négatifs.

Par ailleurs, cette étude a permis d'optimiser le protocole de recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché par la méthode VIDAS ECO (ISO 16140), en augmentant la masse d'échantillon analysée et en améliorant ainsi la probabilité de détecter le pathogène recherché, tout en prenant en compte, d'autre part, les contraintes des industriels de la viande (i.e.

rapidité et simplicité de l'analyse, faible coût des tests...). Trois nouveaux protocoles de recherche simplifiés et rapides ont ainsi été proposés aux industriels : 25g de steak haché prélevés dans la mûlée puis enrichis, avant détection par la méthode VIDAS ECO, dans 225ml d'eau peptonée tamponnée (25g:225ml) pendant 8 heures à 41,5°C; 75g:175ml d'EPT en 16-18h à 41,5°C + VIDAS ECO; et 375g:750ml d'EPT en 24h à 41,5°C + VIDAS ECO. Ces protocoles ont, en outre, été validés en utilisant des souches stressées au froid.

D'autre part, notre étude met l'accent sur l'intérêt d'utiliser des approches complémentaires et pertinentes pour une plus grande maîtrise de *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée. La première stratégie, qui s'avère néanmoins coûteuse en terme de temps et d'argent pour l'industriel, consisterait ainsi à échantillonner les carcasses de bovins dès la fin de l'abattage. Une seconde approche moins onéreuse, basée sur le contrôle des minerais, pourrait également être envisagée de façon à contrôler l'ensemble de la matière première et permettre alors de réduire *in fine* les contaminations lors de la fabrication du haché.

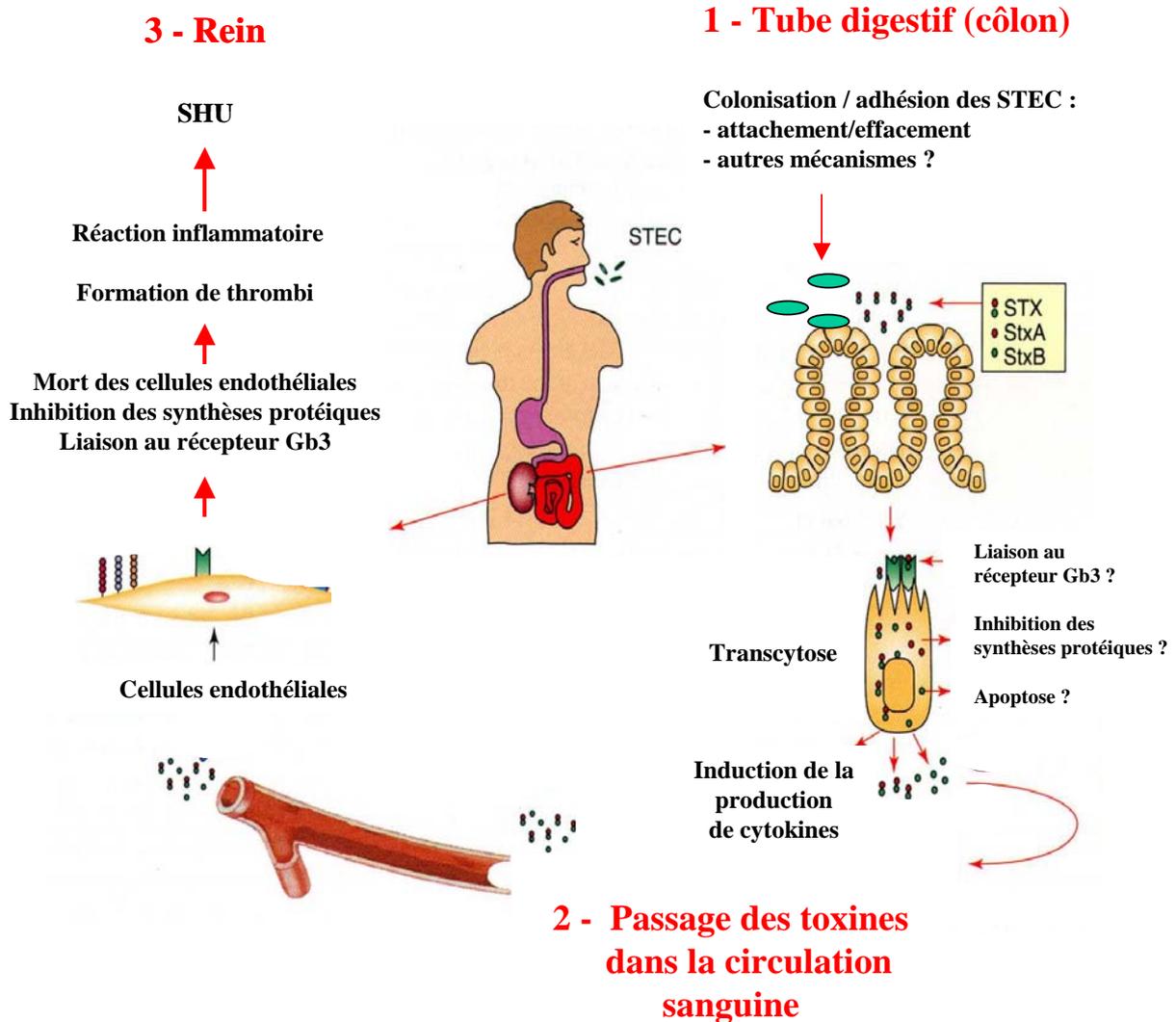
Enfin, les premiers résultats obtenus dans le cadre du projet TEMP'O157:H7[®] laissent apparaître la possibilité d'élaborer un nouveau kit de détection rapide et de dénombrement de *E. coli* O157:H7. Ce nouveau test rapide permettrait ainsi de satisfaire les attentes des industriels en terme, d'une part, de maîtrise du pathogène (contrôles sur matière première et produit fini) et, d'autre part, de gestion du risque lors d'une contamination (évaluation du niveau de contamination de la production).



ANNEXES...

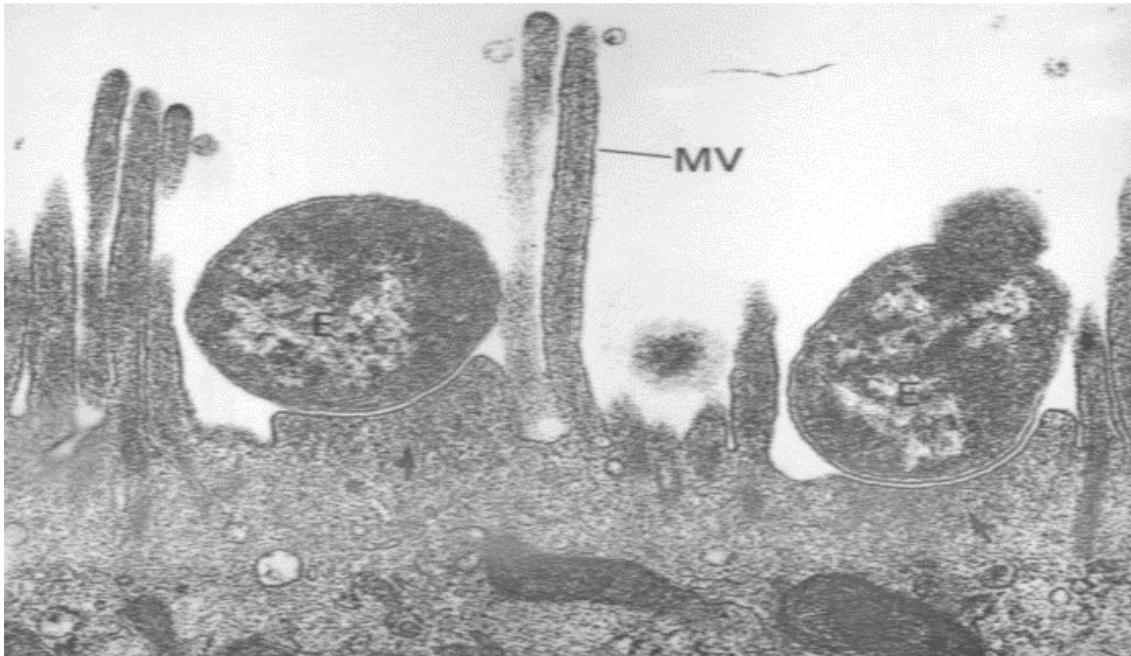


ANNEXE I : Principales étapes du processus infectieux des STEC d'après M. Soriani (Heyderman et al., 2001) adapté par V. Livrelli



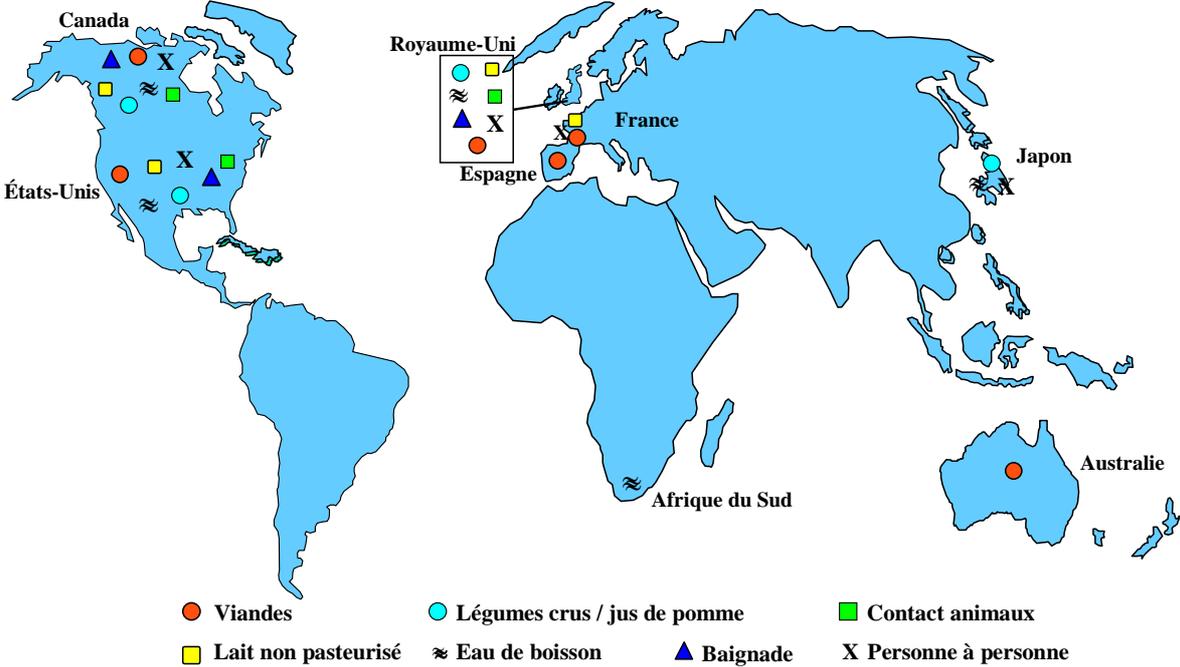
Après ingestion, les STEC doivent résister à l'acidité de l'estomac. Une étape de colonisation du tube digestif est probablement nécessaire : la plupart des souches STEC (en particulier celles de sérotype O157:H7) sont capables de produire des lésions d'attachement/effacement ; pour les autres, les mécanismes 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 (Gb3) localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les toxines Stx entraînent la mort des cellules cibles 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).

ANNEXE II : 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.

ANNEXE IV : Répartition géographique des épidémies d'infections à STEC dans le monde avec leurs modes de transmission identifiés



ANNEXE V : Appréciation de la « propreté des bovins »

origine : INSTITUT DE L'ELEVAGE	<i>Base commune aux référentiels de certification de produits viande qui impliquent les élevages de bovins</i>	Réf : REFER 06
		Rev : 1
	Grille d'appréciation de la propreté des bovins	27/03/2003

1 - Principe

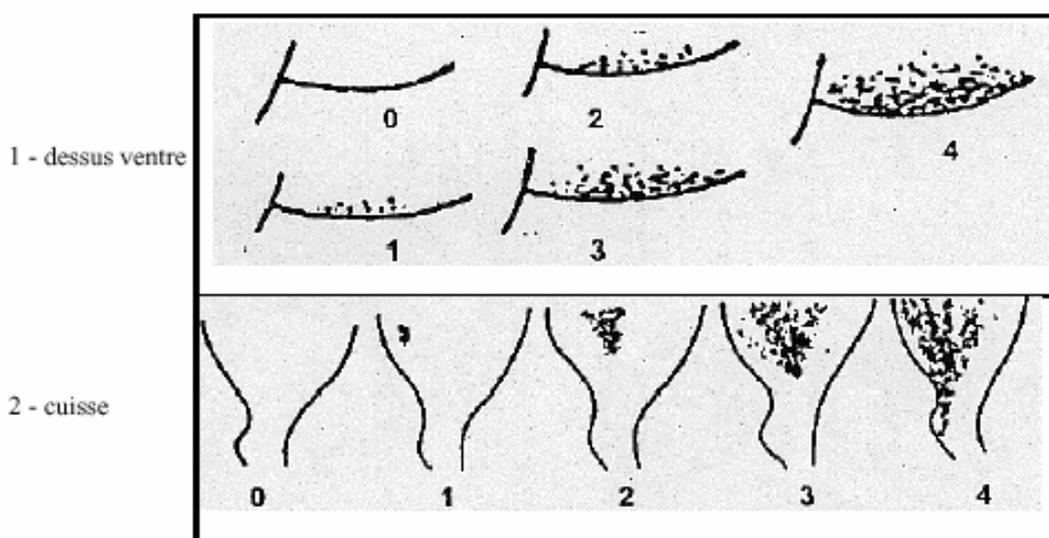
Elle est adaptée de la méthode mise au point par l'INRA (1) pour évaluer la propreté des vaches laitières afin de permettre une application sur tout type de bovin.

Elle consiste à « pointer » le niveau de propreté de **2 régions anatomiques** sur la base d'une échelle comportant 5 niveaux, notés : 0 - 1 - 2 - 3 - 4 (voir illustration).

Pour un animal donné, l'addition des 2 notes aboutit à une note globale de sa propreté qui s'échelonne de 0 à 8.

Lorsque le pointage est réalisé sur un **groupe d'animaux**, le rapport entre le **total des notes** individuelles et le nombre de bovins du groupe permet de calculer la note moyenne du groupe et d'en apprécier le niveau de propreté.

Références illustrées pour la notation de propreté des bovins



Définition de la classe de propreté pour un animal ou un lot :

<i>note totale comprise entre</i>	<i>appréciation</i>
0 - < 2	très propre
3 - < 4	propre
4 - < 6	un peu sale
6 - < 8	sale
8	très sale

(1) observation de la propreté des vaches laitières et des stabulations. L'indice de propreté B. FAYE, J. BARNOUIN. Bull. Tech. CRZV - Theix INRA - 1985, (59) 61 - 67

ANNEXE VI : Critères d'hygiène pour les carcasses de bovins

Denrée alimentaire	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites		Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M		
Carcasses de bovins	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm ²	5,0 log ufc/cm ²	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de processus
	Entérobactériacé			1,5 log ufc/cm ²	2,5 log ufc/cm ²		
	<i>Salmonella</i>	50*	2 [†]	Absence dans la partie examinée de la carcasse			

n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs supérieures à m ou comprises entre m et M.

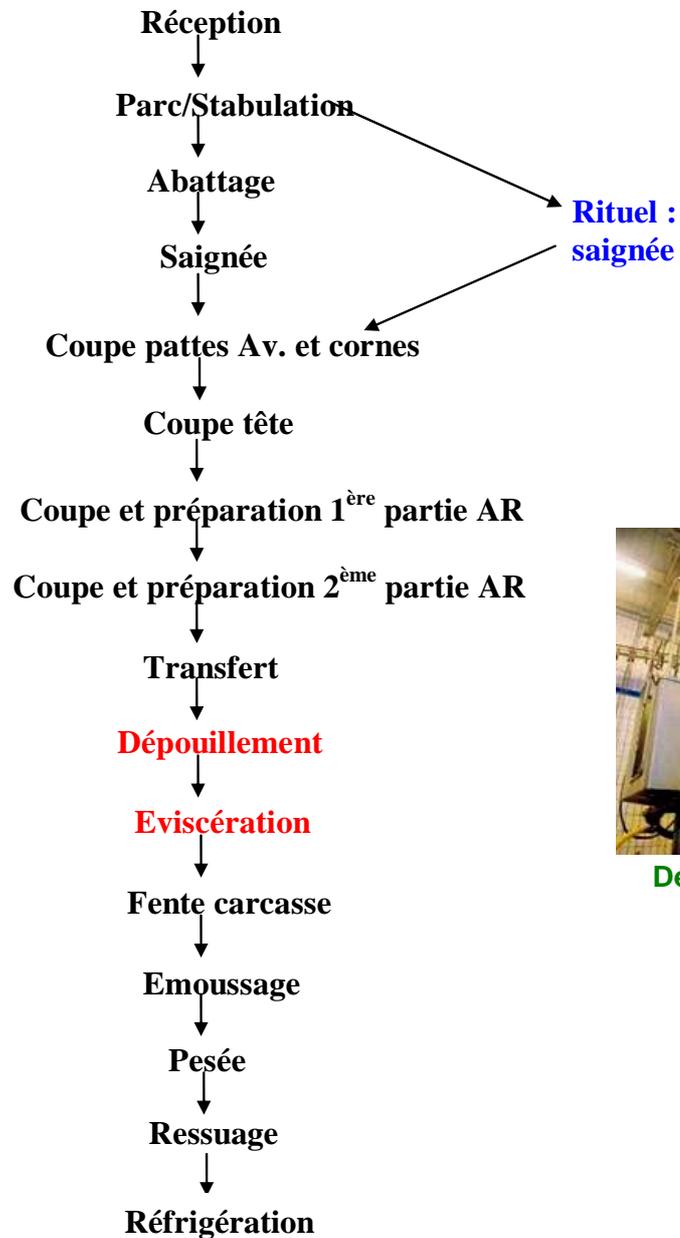
* Les 50 échantillons sont prélevés au cours de 10 échantillonnages consécutifs conformément aux règles et fréquence d'échantillonnage fixées dans le présent règlement.

[†] Nombre d'échantillons où la présence de salmonelles est détectée. La valeur c est soumise à réexamen afin de prendre en compte les progrès réalisés en matière de réduction de la prévalence des salmonelles. Les États membres ou les régions où la prévalence des salmonelles est faible peuvent utiliser des valeurs c moins élevées même avant le réexamen.

ANNEXE VII : Chaîne d'abattage de bovins



Abattage et saignée



Dépouillement

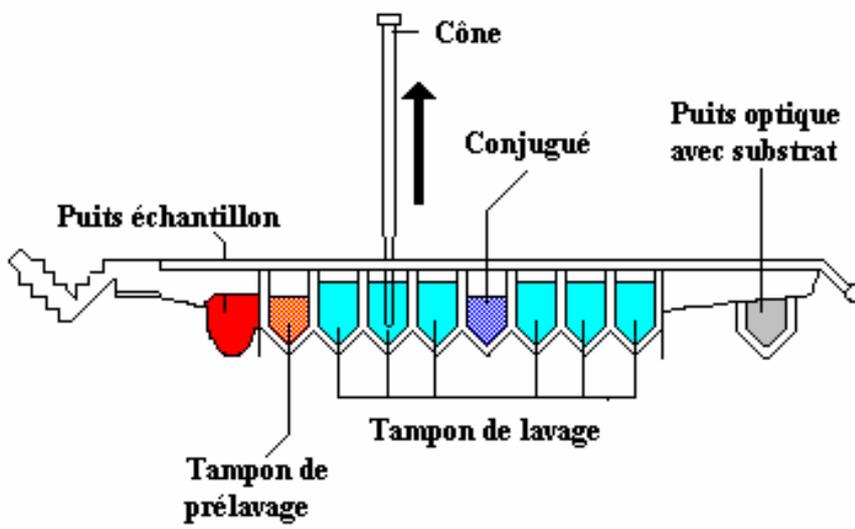


Eviscération et fente

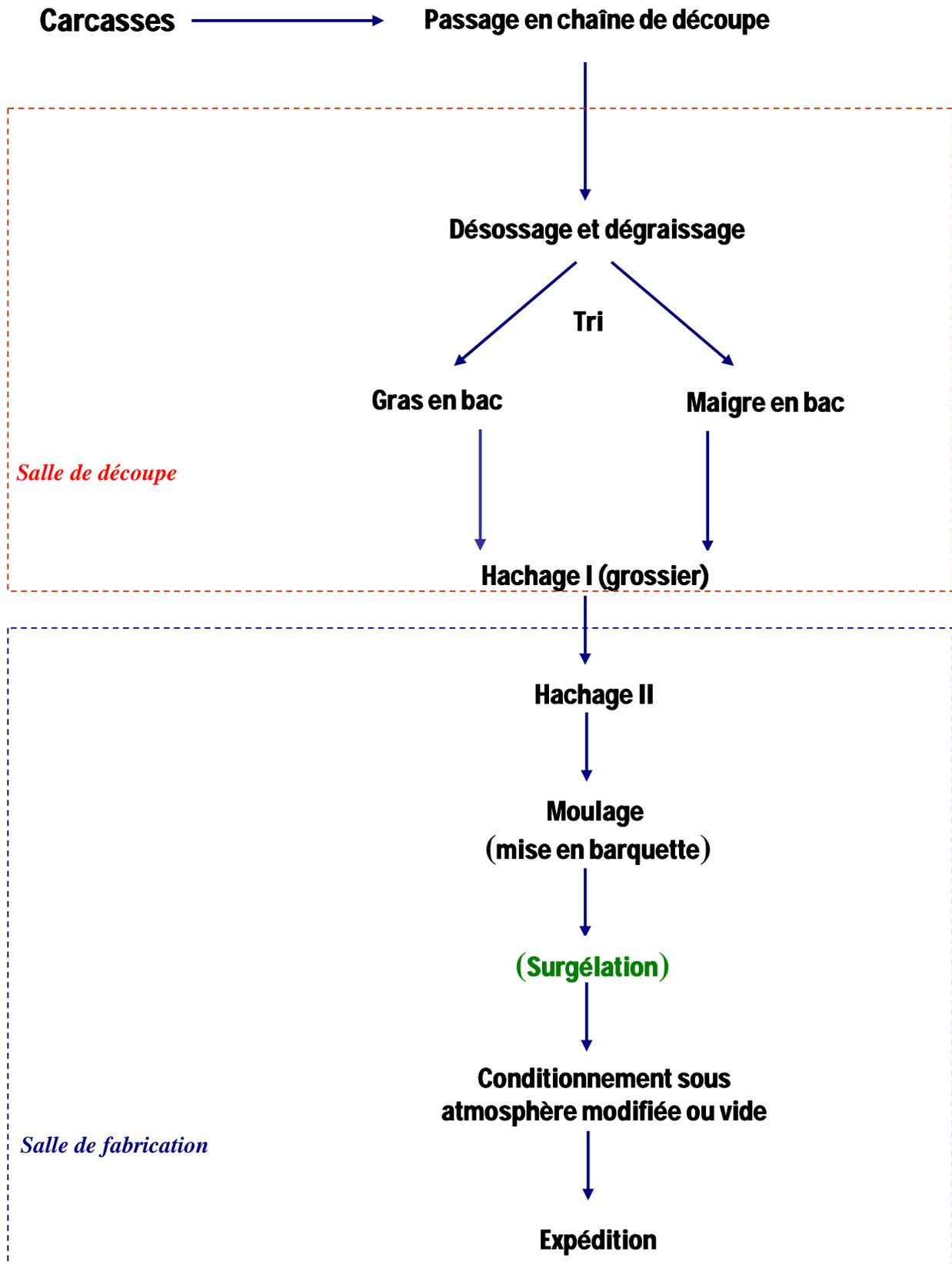


Réfrigération des carcasses

ANNEXE VIII : Barrettes VIDAS ECO



ANNEXE IX : Schéma de production du steak haché





BIBLIOGRAPHIE...



1. **Abdul-Raouf, U. M., L. R. Beuchat, and M. S. Ammar.** 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol* **59**:2364-2368.
2. **Ackers, M. L., B. E. Mahon, E. Leahy, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Bibb, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin, and L. Slutsker.** 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**:1588-1593.
3. **AFSSA.** 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
4. **Alavi, S. H., V. M. Puri, S. J. Knabel, R. H. Mohtar, and R. C. Whiting.** 1999. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *J Food Prot* **62**:170-176.
5. **Anderson, M., H. Huff, H. Naumann, R. Marshall, J. Daimare, R. Johnson, and M. Pratt.** 1987. Evaluation of swab and tissue excision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses. *J Food Prot* **50**:741-743.
6. **Andrade, J. R., V. F. Da Veiga, M. R. De Santa Rosa, and I. Suassuna.** 1989. An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **28**:49-57.
7. **Anonyme.** 2005. BAX System : Methods comparison - *E. coli* O157:H7 MP Assay versus Culture in Raw Ground Beef and Beef Trim. DuPont Qualicon AOAC Data.
8. **Arthur, T. M., J. M. Bosilevac, X. Nou, S. D. Shackelford, T. L. Wheeler, M. P. Kent, D. Jaroni, B. Pauling, D. M. Allen, and M. Koohmaraie.** 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J Food Prot* **67**:658-665.

9. **Augustin, J. C., A. Brouillaud-Delattre, L. Rosso, and V. Carlier.** 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**:1706-1710.
10. **Baranyi, J., and T. A. Roberts.** 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* **23**:277-294.
11. **Baranyi, J., and T. A. Roberts.** 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* **26**:199-218.
12. **Baranyi, J., T. P. Robinson, A. Kaloti, and B. M. Mackey.** 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int J Food Microbiol* **27**:61-75.
13. **Barrett, T. J., J. B. Kaper, A. E. Jerse, and I. K. Wachsmuth.** 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J Infect Dis* **165**:979-980.
14. **Barkocy-Gallagher, G. A., T. M. Arthur, M. Rivera-Betancourt, X. Nou, S. D. Shackelford, T. L. Wheeler, and M. Koohmaraie.** 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J Food Prot* **66**:1978-1986.
15. **Barkocy-Gallagher, G. A., K. K. Edwards, X. Nou, J. M. Bosilevac, T. M. Arthur, S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie.** 2005. Methods for recovering *Escherichia coli* O157:H7 from cattle fecal, hide, and carcass samples: sensitivity and improvements. *J Food Prot* **68**:2264-2268.
16. **Beebakhee, G., M. Louie, J. De Azavedo, and J. Brunton.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* **70**:63-68.
17. **Begum, D., and M. P. Jackson.** 1995. Direct detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **9**:259-264.

18. **Bélangier, S. D., M. Boissinot, C. Menard, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 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.
19. **Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffin, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr, C. A. Bartleson, J. H. Lewis, T. J. Barrett, and J. G. Wells.** 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.
20. **Bellin, T., M. Pulz, A. Matussek, H. G. Hempen, and F. Gunzer.** 2001. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol* **39**:370-374.
21. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**:1539-1546.
22. **Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M. Griffin.** 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* **269**:2217-2220.
23. **Beumer, R. R.** 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food microbiol* **13**:333-340.
24. **Beutin, L., J. Prada, S. Zimmermann, R. Stephan, I. Orskov, and F. Orskov.** 1988. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* **267**:576-588.
25. **Beutin, L., M. A. Montenegro, I. Orskov, F. Orskov, J. Prada, S. Zimmermann, and R. Stephan.** 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **27**:2559-2564.

26. **Beutin, L., S. Zimmermann, and K. Gleier.** 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.
27. **Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, S. Aleksic, H. A. Gillespie, and T. S. Whittam.** 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.
28. **Beutin, L., M. Bulte, A. Weber, S. Zimmermann, and K. Gleier.** 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.
29. **Blackburn, C., and J. McCarthy.** 2000. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int J Food Microbiol* **55**:285-290.
30. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, E. A. Gonzalez, M. P. Alonso, H. Maas, and W. H. Jansen.** 1996. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol* **12**:13-19.
31. **Bonardi, S., E. Maggi, G. Pizzin, S. Morabito, and A. Caprioli.** 2001. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol* **66**:47-53.
32. **Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. Van der Noorda.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**:495-503.

33. **Bosilevac, J. M., T. M. Arthur, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Rossman, J. O. Reagan, and M. Koohmaraie.** 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *J Food Prot* **67**:646-650.
34. **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.
35. **Bovill, R., J. Bew, N. Cook, M. D'Agostino, N. Wilkinson, and J. Baranyi.** 2000. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *Int J Food Microbiol* **59**:157-165.
36. **Bovill, R. A., J. Bew, and J. Baranyi.** 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.
37. **Brenner, D., G. Fanning, G. Miklos, and A. Steigerwalt.** 1973. Polynucleotide sequence relatedness among shigella species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**:1-7.
38. **Breuer, T., D. H. Benkel, R. L. Shapiro, W. N. Hall, M. M. Winnett, M. J. Linn, J. Neimann, T. J. Barrett, S. Dietrich, F. P. Downes, D. M. Toney, J. L. Pearson, H. Rolka, L. Slutsker, and P. M. Griffin.** 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* **7**:977-982.
39. **Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine.** 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* **192**:1422-1429.

40. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* **24**:767-778.
41. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **142**:3305-3315.
42. **Buchanan, R., R. Whiting, and W. Damert.** 1997. When is simple good enough : a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food microbiology* **14**:313-321.
43. **Buchanan, R. L., and L. K. Bagi.** 1997. Microbial competition : effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *J Food Prot* **60**:254-261.
44. **Buchanan, R. L., and S. G. Edelson.** 1999. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot* **62**:211-218.
45. **Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner.** 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* **26**:4196-4204.
46. **Cahen P.** 1997. "The Food and drug administration" autorise l'irradiation des viandes. *La Semaine Vétérinaire*:879.
47. **Calderwood, S., D. Akeson, G. Keusch, T. Barrett, and P. Griffin.** 1996. Proposed New Nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62**:118-119.
48. **Campbell, G. A., J. Uknalis, S.I. Tu, and R. Mutharasan.** 2006. Detect of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors. *Biosensors & Bioelectronics* **In Press**.

49. **Capita, R., M. Prieto, and C. Alonso-Calleja.** 2004. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *J Food Prot* **67**:1303-1308.
50. **Caprioli, A., and A. E. Tozzi.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In : *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC : American Society for Microbiology, p. 38-48.
51. **Carlin, F., C. Nguyen-The, and C. Morris.** 1996. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *J Food Prot* **59**:698-703.
52. **Carney, E., S. B. O'Brien, J. Sheridan, D. McDowell, I. Blair, and G. Duffy.** 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food microbiol* **23**:52-59.
53. **Cassels, F. J., and M. K. Wolf.** 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* **15**:214-226.
54. **CDC.** 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly* **49**:911-913.
55. **CDC.** 2006. *E. coli* O157:H7 outbreak from fresh spinach. Not Published.
56. **CDSC.** 2000. Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurized milk. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **10**:203-206.
57. **Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng.** 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **33**:248-250.
58. **Cerqueira, A. M., B. E. Guth, R. M. Joaquim, and J. R. Andrade.** 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol* **70**:111-121.

59. **Chalmers, R. M., R. L. Salmon, J. Evans, H. Chart, S. M. Kench, T. J. Colemean, D. Meadows, P. Morgan-Capner, P. Softley, and M. Sillis.** 1999. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) : risk factors in the farming environment. Second International Symposium of the European study Group on EHEC (Brussels). *Acta Clinica Belgica* **54**:37.
60. **Chan, A. B., and J. D. Fox.** 1999. NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Review of Medical Microbiology* **10**:185-196.
61. **Chapman, P. A., C. A. Siddons, D. J. Wright, P. Norman, J. Fox, and E. Crick.** 1992. Cattle as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Rec* **131**:323-324.
62. **Chapman, P., A. C. Malo, M. Ellin, R. Ashton, and Harkin.** 2001. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol* **64**:139-150.
63. **Chen, J., R. Johnson, and M. Griffiths.** 1998. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**:147-152.
64. **Cheville, A. M., K. W. Arnold, C. Buchrieser, C. M. Cheng, and C. W. Kaspar.** 1996. rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **62**:1822-1824.
65. **Choi, S. H., D. J. Baumler, and C. W. Kaspar.** 2000. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **66**:3911-3916.
66. **Cieslak, P. R., T. J. Barrett, P. M. Griffin, K. F. Gensheimer, G. Beckett, J. Buffington, and M. G. Smith.** 1993. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* **342**:367.

67. **Clavero M.R.S., J. D. Monk, L. R. Beucht, M. P. Doyle, and R. E. Brackett.** 1994. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonellae* and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* **60**:2069-2075.
68. **Cobbold, R., and P. Desmarchelier.** 2001. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Vet Microbiol* **79**:323-335.
69. **Cody, S. H., M. K. Glynn, J. A. Farrar, K. L. Cairns, P. M. Griffin, J. Kobayashi, M. Fyfe, R. Hoffman, A. S. King, J. H. Lewis, B. Swaminathan, R. G. Bryant, and D. J. and Vugia.** 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med* **130**:202-209.
70. **Coia, J. E.** 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**:1-9.
71. **Coia, J. E., Y. Johnston, N. J. Steers, and M. F. Hanson.** 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.
72. **Colwell, R. R., B. DP.R., G. D.J., D. B. Roszak, H. S.A., and O. L. M.** 1985. Viable, bio non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* **3**:817-820.
73. **Cookson, S. T., and J. P. Nataro.** 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **21**:421-434.
74. **Coquard, D., S. Offinet, A. Houdaf, S. Sacherer, D. Frechon, and M. Leguerb-Fellous.** 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 - Illkirsch, France.

75. **Cornu, M., M. L. Delignette-Muller, and J. P. Flandrois.** 1999. Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling. *Appl Environ Microbiol* **65**:5322-7.
76. **Cornu, M., R. Pouillot, and M. Delignette.** 2002. Modèle de compétition entre flore pathogène et flore annexe dans un aliment. Communication Lille, Congrès Agro-industrie et Méthodes statistiques.
77. **Cowden, J., S. Ahmed, M. Donaghy, and A. Riley.** 2001. Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect* **26**:335-341.
78. **Criquelion J.** 1996. Méthode HACCP : Plan d'hygiène. Méthodologie pour une investigation fine d'un système de production et élaboration du plan d'hygiène. *Microbiologie & Hygiène Alimentaire (Hygiène et désinfection)* **7**:32-34.
79. **Crowley, H., C. Cagney, J. J. Sheridan, W. Anderson, D. A. McDowell, I. S. Blair, R. H. Bishop, and G. Duffy.** 2005. *Enterobacteriaceae* in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. **22**:409-414.
80. **Crump, J. A., A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M. Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, P. M. Griffin, and T. J. Van Gilder.** 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* **347**:555-560.
81. **Cui, S., C. Schroeder, D. Zhang, and J. Meng.** 2003. Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Appl Microbiol* **95**:129-134.
82. **Cutter C.N., and Siragusa G.R.** 1994. Efficacy of organics acids against *Escherichia coli* O157 :H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *J Food Protect.* **57**:97-103.

83. **Dalgaard, P.** 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int J Food Microbiol* **26**:305-317.
84. **Decludt, B., P. Bouvet, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, P. A. Grimont, B. Hubert, C. Loirat, and a. S. d. N. P. Pediatrique.** 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect* **124**:215-220.
85. **Del-Campo, J., F. Carlin, and C. Nguyen-The.** 2001. Effects of epiphytic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *J Food Prot* **64**:721-724.
86. **Delignette-Muller, M. L.** 1998. The relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *Int J Food Microbiol* **43**:97-104.
87. **Delignette-Muller, M., F. Baty, M. Cornu, and H. Bergis.** 2005. Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **100**:77-84.
88. **Delignette-Muller, M. L., M. Cornu, R. Pouillot, and J. B. Denis.** 2006. Use of Bayesian modelling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* **106**:195-208.
89. **Deng MY., and P. M. Fratamico.** 1996. A multiplex PCR for rapid identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from foods. *J Food Protect* **59**:570-576.
90. **Desmarchelier, P.M., S.S. Bilge, N. Fegan, L. Mills, J.C. Vary, and P.I. Tarr.** 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* **36**:1801-1804.
91. **DeVinney, R., A. Gauthier, A. Abe, and B. B. Finlay.** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* **55**:961-976.

92. **Devlieghere, F., A. H. Geeraerd, K. J. Versyck, B. Vandewaetere, J. V. Impe, and J. Debevere.** 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products : a predictive model. *Food microbiology* **18**:53-66.
93. **Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy, and J. B. Kaper.** 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.
94. **Doyle, M., and J. Schoeni.** 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh Meats and Poultry. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:2394-2396.
95. **Doyle, M. P.** 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* **12**:289-301.
96. **Duffy G., R.C. Whiting, and J. J. Sheridan.** 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food microbiology* **16**:299-307.
97. **Dufrenne, J., E. Delfgou, W. Ritmeester, and S. Notermans.** 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.
98. **Eisel, W., R. Linton, and P. Muriana.** 1997. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food microbiology* **14**:273-282.
99. **Emswiler, B. S., J. E. Nichols, A. W. Kotula, and D. K. Rough.** 1978. Device for microbiological sampling of meat surfaces. *J Food Prot* **41**:546-548.
100. **Espié, E., and V. Vaillant.** 2003. Toxi-infection collective Alimentaire à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, gironde Juin 2002-rapport d'investigation. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France.

101. **Espié, E., P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, N. Pihier, V. Vaillant, S. Francart, H. de Valk, and C. Vernozy-Rozand.** 2006. Shigatoxin Producing *Escherichia coli* O26 Infection and Unpasteurised Cows Cheese, France 2005. In 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
102. **Ettriqui A.** 1989. Prévention des toxi-infections alimentaires d'origine bactérienne. Rev Microbiol Hygiène Alimentaire **1**:17-20.
103. **Fach, P., S. Perelle, F. Dilasser, and J. Grout.** 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.
104. **Fagan, P. K., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic.** 1999. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl Environ Microbiol **65**:868-872.
105. **Fegan, N., G. Higgs, P. Vanderlinde, and P. Desmarchelier.** 2005. An investigation of *Escherichia coli* O157 contamination of cattle during slaughter at an abattoir. J Food Prot **68**:451-457.
106. **Feng, P.** 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Emerg Infect Dis **1**:47-52.
107. **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.
108. **Feng, P., K. A. Lampel, H. Karch, and T. S. Whittam.** 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis **177**:1750-1753.

109. **Fenlon, D. R., I. D. Ogden, A. Vinten, and I. Svoboda.** 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. Symp Ser Soc Appl Microbiol:149S-156S.
110. **Fields P.I., K. Blom, H. J. Hugues, L. O. Hesel, P. Feng, and B. Swaminathan.** 1997. Molecular characterisation 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.
111. **Fliss, I., R. E. Simard, and A. Ettriki.** 1991. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. J. Food Science **56**:249-251.
112. **Fong, J. S., J. P. de Chadarevian, and B. S. Kaplan.** 1982. Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. Pediatr Clin North Am **29**:835-856.
113. **Fortin, N. Y., A. Mulchandani, and W. Chen.** 2001. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. Anal Biochem **289**:281-288.
114. **Fremaux, B., S. Raynaud, L. Beutin, and C. Vernozy-Rozand.** 2006. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. Vet Microbiol **117**:180-191.
115. **Fremaux, B., M. L. Delignette-Muller, C. Prigent-Combaret, A. Gleizal, and C. Vernozy-Rozand.** 2007a. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. J Appl Microbiol **102**:89-99.
116. **Fremaux, B., M. Berardin, and C. Vernozy-Rozand.** 2007b. Genetic methods for typing Shiga-toxin variants of *Escherichia coli*. **In Press.**
117. **Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri, and C. L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. J Gen Microbiol **136**:1125-1135.

118. **Gannon VP, S. D. Souza, T. Graham, R. King, K. Rahn, and S. Read.** 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **35**:656-662.
119. **Gehring, A. G., P. L. Irwin, S. A. Reed, S. I. Tu, P. E. Andreotti, H. Akhavan-Tafti, and R. S. Handley.** 2004. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J Immunol Methods* **293**:97-106.
120. **Ghebru, H.** 1988. Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise es sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes.
121. **Gibson, A. M., N. Bratchell, and T. A. Roberts.** 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.
122. **Gilgen, M., P. Hubner, C. Hofelein, J. Luthy, and U. Candrian.** 1998. PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res Microbiol* **149**:145-154.
123. **Gill, C. O., and T. Jones.** 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *J Food Prot* **63**:167-173.
124. **Gimenez, B., and P. Dalgaard.** 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* **96**:96-109.
125. **Glass, K., J. Loeffelholz, J. Ford, and M. Doyle.** 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.
126. **Gonthier, A., V. Guérin-Faubleé, B. Tilly, and M. L. Delignette-Muller.** 2001. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. *Lett Appl Microbiol* **33**:352-356.

127. **Grau, F. H., and P.B.Vanderline.** 1992. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J Food Prot* **55**:4-7.
128. **Greatorex, J. S., and G. M. Thorne.** 1994. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **32**:1172-1178.
129. **Griffin, P. M., L. C. Olmstead, and R. E. Petras.** 1990. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* **99**:142-149.
130. **Griffin, P., and Tauxe, RV.** 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.
131. **Griffin, P. M.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infectious of the Gastrointestinal Tract/* Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, p. 739-758.
132. **Griffin, P. M.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. In : *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC : American Society for Microbiology, p. 15-22.
133. **Griffin, P., P. Mead, T. Van Gilder, S. Hunter, N. Strockbine, and R. Tauxe.** 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.
134. **Grimont, P.** 1987. Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect Numéro spécial*.

135. **Guerini, M. N., T. M. Arthur, S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie.** 2006. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. *J Food Prot* **69**:1007-1011.
136. **Guillier, L., P. Pardon, and J. C. Augustin.** 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **71**:2940-2948.
137. **Gun, H., A. Yilmaz, S. Turker, A. Tanlasi, and H. Yilmaz.** 2003. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *Food microbiology* **84**:339-344.
138. **Gunzer, F., H. Bohm, H. Russmann, M. Bitzan, S. Aleksic, and H. Karch.** 1992. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **30**:1807-1810.
139. **Guyon, R., F. Dorey, J. Malas, F. Grimont, J. Foret, B. Rouvière, and J. Collobert.** 2001. Superficial contamination of bovine carcasses by *Escherichia coli* O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy. *Meat Sci* **58**:329-331.
140. **Hambraeus, A., J. Hoborn, and W. Whyte.** 1990. Skin sampling-validation of a pad method and comparison with commonly used methods. *J Hosp Infect* **16**:19-27.
141. **Heuvelink, A., B. Bleumink, F. v. d. Biggelaar, M. T. Giffel, R. Beumer, and E. d. Boer.** 1998. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *J Food Prot* **61**:1597-1601.
142. **Heuvelink, A. E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, R. R. Beumer, and E. de Boer.** 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* **62**:1115-1122.
143. **Heyderman, R. S., M. Soriani, and T. R. Hirst.** 2001. Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol* **9**:262-266.

144. **Hilborn, E. D., J. H. Mermin, P. A. Mshar, J. L. Hadler, A. Voetsch, C. Wojtkunski, M. Swartz, R. Mshar, M. A. Lambert-Fair, J. A. Farrar, M. K. Glynn, and L. Slutsker.** 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med* **159**:1758-1764.
145. **Hilborn, E. D., P. A. Mshar, T. R. Fiorentino, Z. F. Dembek, T. J. Barrett, R. T. Howard, and M. L. Cartter.** 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.
146. **Hildebrand, J. M., H. C. Maguire, R. E. Holliman, and E. Kangesu.** 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev* **6**:33-36.
147. **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.
148. **Huppertz, H., D. Busch, H. Schmidt, S. Aleksic, and H. Karch.** 1996. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *J Pediatr* **128**:341-346.
149. **Hurley, B. P., M. Jacewicz, C. M. Thorpe, L. L. Lincicome, A. J. King, G. T. Keusch, and D. W. Acheson.** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **67**:6670-6677.
150. **ICMSF.** 1996. Microbiological specifications of food pathogens. In *Microorganisms in food. Vol 5. London: Blackie academic and professional Publ.*
151. **Igarashi, K., J. Ogasawara, H. Ito, T. Yutsudo, and Y. Takeda.** 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.

152. **Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc, and P. M. Sherman.** 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:3316-3326.
153. **Iyoda, S., K. Tamura, K. Itoh, H. Izumiya, N. Ueno, K. Nagata, M. Togo, J. Terajima, and H. Watanabe.** 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.
154. **Jameson, J. E.** 1962. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J Hyg (Lond)* **60**:193-207.
155. **Jarvis, K. G., and J. B. Kaper.** 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**:4826-4829.
156. **Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:7839-7843.
157. **Jerse, A. E., and J. B. Kaper.** 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* **59**:4302-4309.
158. **Johnson, J. L., C. L. Brooke, and S. J. Fritschel.** 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.
159. **Kaddu-Mulindw, D., T. Aisu, K. Gleier, S. Zimmermann, and L. Beutin.** 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.

160. **Karch, H., and T. Meyer.** 1989. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol **27**:1180-1186.
161. **Karch, H., H. Russmann, H. Schmidt, A. Schartzkopf, and J. Heesemann.** 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. J Clin Microbiol **33**:1602-1605.
162. **Karch, H., C. Janetzki-Mittmann, S. Aleksic, and M. Datz.** 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.
163. **Karch, H., H. Huppertz, J. Bockemuhl, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and R. Lissner.** 1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. J Food Prot **11**:1454-1457.
164. **Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, and C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet **1**:619-620.
165. **Karmali M.A., G.S. Arbus , M. Petric , M.L. Patrick , M. Roscoe , J. Karmali Shaw, and H. Lior.** 1988. Hospital-acquired *Escherichia coli* O157:H7 associated haemolytic uraemic syndrome in a nurse. Lancet **1**:526.
166. **Karmali, M. A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev **2**:15-38.
167. **Karmali, M. A., M. Petric, and M. Bielaszewska.** 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.
168. **Kauffmann, F.** 1947. The serology of the *E. coli* group. Journal of Immunology **57**:71-100.

169. **Keene, W. E., J. M. McAnulty, L. P. Williams, K. Hedberg, and D. W. Fleming.** 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. **33**:354.
170. **Keer, J. T., and L. Birch.** 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods* **53**:175-183.
171. **Kehl, K. S., P. Havens, C. E. Behnke, and D. W. Acheson.** 1997. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **35**:2051-2054.
172. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.
173. **Kitchell, A. G., G. C. Ingram, and W. R. Hudson.** 1973. Microbial sampling in abattoirs, p. 43-61. In R. G. Board and D. W. Lovelock (ed.), *Sampling-microbiological monitoring of environments*. Academic Press, London.
174. **Klie, H., M. Timm, H. Richter, P. Gallien, K. W. Perlberg, and H. Steinruck.** 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.
175. **Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish.** 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**:69-77.
176. **Kobayashi, H., J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, and K. Yamamoto.** 2001. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol* **67**:484-489.

177. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**:775-779.
178. **Koutkia P., E. Mylonakis, and T. Flanigan.** 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 :H7- an emerging pathogen. *Am Fam Phys* **56**:853-857.
179. **Kovacs, M. J., J. Roddy, S. Gregoire, W. Cameron, L. Eidus, and J. Drouin.** 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**:177-179.
180. **Lazarus, C. R., A. Abu-Bakar, R. L. West, and J. L. Oblinger.** 1977. Comparison of microbial counts on beef carcasses by using the moist-swab contact method and secondary tissue removal technique. *Appl Environ Microbiol* **33**:217-218.
181. **Lea, N., J. M. Lord, and L. M. Roberts.** 1999. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* **145**:999-1004.
182. **Le Minor L., M. Y. Popoff, and J. Bockemuhl.** 1990. Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **141**:1173-1177.
183. **Lerman, Y., D. Cohen, A. Gluck, E. Ohad, and I. Sechter.** 1992. A cluster of cases of *Escherichia coli* O157 infection in a day-care center in a communal settlement (kibbutz) in Israel. *J Clin Microbiol* **30**:520-521.
184. **Levine, M., and R. Edelman.** 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**:31-51.
185. **Levine, M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* **155**:377-389.

186. **Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda.** 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* **37**:543-548.
187. **Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W. Foster.** 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**:3094-3100.
188. **Lindgren, S. W., A. R. Melton, and A. D. O'Brien.** 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* **61**:3832-3842.
189. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-8839.
190. **Loirat, C., V. Baudouin, E. Sonsino, P. Mariani-Kurkdjian, and J. Elion.** 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:pp133-158.
191. **Lopez, E., M. Diaz, S. Grinstein, S. Devoto, F. Mendilaharsu, B. E. Murray, M. Woloj, S. Ashkenazi, E. Rubeglio, M. Vasquez, M. Turco, K. Pirkering, and T. G. Cleary.** 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of shiga-like toxins. *J Infect Dis* **160**:469-475.
192. **Lopez-Gonzalez V., P. S. Murano, R. E. Brennan, and E. A. Murano.** 1999. Influence of various commercial packaging conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 to irradiation by electron beam versus gamma rays. *J Food Prot* **63**:2766-2769.
193. **Louie, M., S. Read, L. Louie, K. Ziebell, K. Rahn, A. Borczyk, and H. Lior.** 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect* **123**:17-24.

194. **Ludwig, K., M. Petric, V. Blanchette, and M. Karmali.** 1998. Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin Infect Dis* **27**:660-661.
195. **Mackenzie, A. M., P. Lebel, E. Orrbine, P. C. Rowe, L. Hyde, F. Chan, W. Johnson, and P. N. McLaine.** 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 SYNSORB Pk Study investigators. *J Clin Microbiol* **36**:1608-1611.
196. **Mailles, A., P. Mariani-Kurkdjian, C. Vernozy-Rozand, F. Grimont, N. Pihier, E. Bingen, B. Horen, V. Doireau, B. Llanas, E. Espié, and V. Vaillant.** 2006. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France 2005. 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
197. **Martin, D. R., P. M. Uhler, A. J. G. Okrend, and J. Y. Chill.** 1994. Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **57**:70-72.
198. **Martinez, A., J. M. Oliva, E. Panella, G. Hernandez-Pezzi, and P. Soler.** 2001. Outbreak of *E. coli* O157:H7 infection in Spain. *Eurosurveillance Weekly* **5**:1.
199. **Massa, S., E. Goffredo, C. Altieri, and K. Natola.** 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Lett Appl Microbiol* **28**:89-92.
200. **Matthews, K. R., P. A. Murdough, and A. J. Bramley.** 1997. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **82**:197-203.
201. **McIngval, S. C., D. Elhanafi, and M. A. Drake.** 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable shiga-toxin producing *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* **68**:799-806.

202. **McIntyre, L., J. Fung, A. Paccagnella, J. Isaac-Renton, F. Rockwell, B. Emerson, and T. Preston.** 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.
203. **McKellar, R. C., and K. P. Knight.** 1999. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. *J Food Prot* **62**:1466-1469.
204. **McMahon, C. M. M.** 1997. Pathogen control in sous vide processing by thermal inactivation and hurdle technology. Ph.D. Thesis, University of Ulster, Jordanstown, Co. Antrim, Northern Ireland.
205. **McMeekin, T., J. Olley, T. Ross, and D. A. Ratkowsky.** 1993. Predictive microbiology: theory and applications. Inc., JWS (ed).
206. **McNamara, A. M.** 2003. A survey of Current Industry Protocols for the Detection of *E. coli* O157:H7 in Raw Ground Beef and Raw Beef Trim. Final Report to the National Cattlemen's Beef Association.
207. **McNamara, A. M., W. A. McMahon, A. Schultz, V. Aleo, R. Huffman, M. Curiale, and R. C. Silliker.** 2005. Validation of Composite Sampling for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Beef Trim and Raw Ground beef. Final Report to the National Cattlemen's Beef Association.
208. **Mechie, S. C., P. A. Chapman, and C. A. Siddons.** 1997. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect* **118**:17-25.
209. **Membre, J. M., T. Ross, and T. McMeekin.** 1999. Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Lett Appl Microbiol* **28**:216-220.
210. **Meyer-Broseta, S., S. N. Bastian, P. D. Arne, O. Cerf, and M. Sanaa.** 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.

211. **Michino, H., K. Araki, S. Minami, S. Takaya, N. Sakai, M. Miyazaki, A. Ono, and H. Yanagawa.** 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.
212. **Miller, L. G., and C. W. Kaspar.** 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot* **57**:460-464.
213. **Milne, L. M., A. Plom, I. Strudley, G. C. Pritchard, R. Crooks, M. Hall, G. Duckworth, C. Seng, M. D. Susman, J. Kearney, R. J. Wiggins, M. Mouldale, T. Cheasty, and G. A. Willshaw.** 1999. *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* **2**:22-26.
214. **Morabito, S., H. Karch, P. Mariani-Kurkdjian, H. Schmidt, F. Minelli, E. Bingen, and A. Caprioli.** 1998. Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **36**:840-842.
215. **Morgan, G. M., C. Newman, S. R. Palmer, J. B. Allen, W. Shepherd, A. M. Rampling, R. E. Warren, R. J. Gross, S. M. Scotland, and H. R. Smith.** 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.
216. **Morgan, D., C. P. Newman, D. N. Hutchinson, A. M. Walker, B. Rowe, and F. Majid.** 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* **111**:181-187.
217. **Moscowitz, E.** 1925. An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med* **36**:89.
218. **Moxley, R. A., and D. H. Francis.** 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**:339-346.

219. **Murinda, S. E., L. T. Nguyen, S. J. Ivey, B. E. Gillespie, R. A. Almeida, F. A. Draughon, and S. P. Oliver.** 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.
220. **Nagano, I., M. Kunishima, Y. Itoh, Z. Wu, and Y. Takahashi.** 1998. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* **42**:371-376.
221. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
222. **Nauta, M. J., and J. Dufrenne.** 1999. Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol* **1**:137-155.
223. **Neaves, P., J. Deacon, and C. Bell.** 1994. A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int Dairy J* **4**:679-696.
224. **Newland, J. W., and R. J. Neill.** 1988. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. *J Clin Microbiol* **26**:1292-1297.
225. **Nou, X., M. Rivera-Betancourt, J. M. Bosilevac, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, B. L. Gwartney, J. O. Reagan, and M. Koochmaraie.** 2003. Effect of chemical dehairing on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* on carcasses in a commercial beef processing plant. *J Food Prot* **66**:2005-2009.
226. **Oberst, R. D., M. P. Hays, L. K. Bohra, R. K. Phebus, C. T. Yamashiro, C. Paszko-Kolva, S. J. Flood, J. M. Sargeant, and J. R. Gillespie.** 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.

227. **O'Brien, A., G. LaVeck, D. Griffin, and M. Thompson.** 1980. Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infection and immunity* **30**:170-179.
228. **O'Brien, A., G. LaVeck, M. Thompson, and S. Formal.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**:763-769.
229. **O'Brien, S. J., G. K. Adak, and C. Gilham.** 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.
230. **O'Brien, S. J., P. S. Murdoch, A. H. Riley, I. King, M. Barr, S. Murdoch, A. Greig, R. Main, W. J. Reilly, and F. M. Thomson-Carter.** 2001b. A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H-phage type 8 in hospital. *J Hosp Infect* **49**:167-172.
231. **Ogden, I. D., N. F. Hepburn, M. MacRae, N. J. Strachan, D. R. Fenlon, S. M. Rusbridge, and T. H. Pennington.** 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.
232. **Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and C. P. Lattuada.** 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.
233. **Orr, P., B. Lorencz, R. Brown, R. Kielly, B. Tan, D. Holton, H. Clugstone, L. Lugtig, C. Pim, and S. MacDonald.** 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand J Infect Dis* **26**:675-684.
234. **Orskov, F., I. Orskov, and J. A. Villar.** 1987. Cattle as a reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 (letter). *Lancet* **2**:276.

235. **Padhye, N. V., and M. P. Doyle.** 1991. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol* **57**:2693-2698.
236. **Pal, A., S. Ghosh, T. Ramamurthy, S. Yamasaki, T. Tsukamoto, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and Y. Takeda.** 1999. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian J Med Res* **110**:83-85.
237. **Palumbo, S. A., J. E. Call, F. J. Schultz, and A. C. Williams.** 1995. Minimum and Maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J Food Prot* **58**:352-356.
238. **Park, S., R. W. Worobo, and R. A. Durst.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit Rev Biotechnol* **21**:27-48.
239. **Paton, A. W., R. M. Ratcliff, R. M. Doyle, J. Seymour-Murray, D. Davos, J. A. Lanser, and J. C. Paton.** 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.
240. **Paton, A. W., E. Voss, P. A. Manning, and J. C. Paton.** 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.
241. **Paton, J. C., and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**:450-479.
242. **Paunio, M., R. Pebody, M. Keskimaki, M. Kokki, P. Ruutu, S. Oinonen, V. Vuotari, A. Siitonen, E. Lahti, and P. Leinikki.** 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* **122**:1-5.

243. **Pavia, A. T., C. R. Nichols, D. P. Green, R. V. Tauxe, S. Mottice, K. D. Greene, J. G. Wells, R. L. Siegler, E. D. Brewer, and D. Hannon.** 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.
244. **Phillips, A. D., and G. Frankel.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**:1496-1500.
245. **Phillips, D., J. Sumner, J. F. Alexander, and K. M. Dutton.** 2001. Microbiological quality of Australian beef. *J Food Prot* **64**:692-696.
246. **Piérard, D., D. Stevens, L. Moriau, H. Lior, and S. Lauwers.** 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin Microbiol Infec* **3**:531-540.
247. **Pinon, A., M. Zwietering, L. Perrier, J. M. Membre, B. Leporq, E. Mettler, D. Thuault, L. Coroller, V. Stahl, and M. Vialette.** 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl Environ Microbiol* **70**:1081-1087.
248. **Pohl, P.** 1993. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* **137**:325-333.
249. **Poschet, F., K. M. Vereecken, A. H. Geeraerd, B. M. Nicolai, and J. F. Van Impe.** 2005. Analysis of a novel class of predictive microbial growth models and application to coculture growth. *Int J Food Microbiol* **100**:107-24.
250. **Pouillot, R., I. Albert, M. Cornu, and J. B. Denis.** 2003. Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **81**:87-104.

251. **Pradel, N., V. Livrelli, C. De Champs, J. B. Palcoux, A. Reynaud, F. Scheutz, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier.** 2000. 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.
252. **Pradel, N., K. Boukhors, Y. Bertin, C. Forestier, C. Martin, and V. Livrelli.** 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.
253. **Price, S., C. Cheng, C. Kaspar, J. Wright, F. DeGraves, T. Penfound, M. Castanie-Cornet, and J. Foster.** 2000. Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **66**:632-637.
254. **Proulx, F., J. P. Turgeon, G. Delage, L. Lafleur, and L. Chicoine.** 1992. Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr* **121**:299-303.
255. **Ransom, J. R., K. E. Belk, R. T. Bacon, J. N. Sofos, J. A. Scanga, and G. C. Smith.** 2002. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/colonic feces, hides, and carcasses. *J Food Prot* **65**:621-626.
256. **Ratkowsky, D. A., R. K. Lowry, T. A. McMeekin, A. N. Stokes, and R. E. Chandler.** 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol* **154**:1222-1226.
257. **Read, S., C. Gyles, R. Clarke, H. Lior, and S. McEwen.** 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect* **105**:11-20.
258. **Read, S. C., R. C. Clarke, A. Martin, S. A. De Grandis, J. Hii, S. McEwen, and C. L. Gyles.** 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes* **6**:153-161.

259. **Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam.** 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**:64-67.
260. **Reid, C. A., S. M. Avery, M. L. Hutchison, and S. Buncic.** 2001. Evaluation of sampling methods to assess the microbiological status of cattle hides. *Food Control* **13**:405-410.
261. **Reida, P., M. Wolff, H. W. Pohls, W. Kuhlmann, A. Lehmacher, S. Aleksic, H. Karch, and J. Bockemuhl.** 1994. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol* **281**:534-543.
262. **Reinders, R., R. De Jonge, and E. G. Evers.** 2003. A statistical method to determine whether micro-organisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Food microbiology* **20**:297.
263. **Richardson, S. E., M. A. Karmali, L. E. Becker, and C. R. Smith.** 1988. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol* **19**:1102-1108.
264. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**:681-685.
265. **Rippey, S. R., L. A. Chandler, and W. D. Watkins.** 1987. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shell-fish. *J Food Prot* **50**:685-690.
266. **Roberts, T. A.** 1995. Microbial growth and survival : developments in predictive modelling. *Int. Biodeter. Biodegr*:297-309.
267. **Ross, T., P. Dalgaard, and S. Tienungoon.** 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* **62**:231-245.

268. **Ross, T., D. A. Ratkowsky, L. A. Mellefont, and T. A. McMeekin.** 2003. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **82**:33-43.
269. **Rosso, L., J. R. Lobry, S. Bajard, and J. P. Flandrois.** 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl Environ Microbiol* **61**:610-616.
270. **Rowe, P. C., E. Orrbine, M. Ogborn, G. A. Wells, W. Winther, H. Lior, D. Manuel, and P. N. McLaine.** 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.
271. **Ryan, C. A., R. V. Tauxe, G. W. Hisek, J. G. Wells, P. A. Stoesz, McFadden, J. H.W., P. W. Smith, G. F. Wright, and P. A. Blake.** 1986. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* **154**:631-638.
272. **Salter, M. A., T. Ross, and T. A. McMeekin.** 1998. Applicability of a model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **85**:357-64.
273. **Samadpour, M., J. E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T. S. Whittam, R. A. Wilson, and P. I. Tarr.** 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.
274. **Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano.** 1996. Enteroggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroggregative *E. coli*. *J Infect Dis* **173**:1019-1022.

275. **Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**:1055-1061.
276. **Schmidt, H., and H. Karch.** 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.
277. **Scotland, S. M., B. Rowe, H. R. Smith, G. A. Willshaw, and R. J. Gross.** 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.
278. **Sekla, L., D. Milley, W. Stackiw, J. Sisler, J. Drew, and D. Sargent.** 1990. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef--Manitoba. *Can Dis Wkly Rep* **16**:103-105.
279. **Selgas, D., M. L. Martin, C. Pin, and C. Casas.** 1993. Attachment of bacteria to meat surfaces: a review. *Meat Science* **34**:265-273.
280. **Sharp, J. C., L. D. Ritchie, J. Curnow, and T. M. Reid.** 1994. High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J Infect* **29**:343-350.
281. **Shere, J. A., K. J. Bartlett, and C. W. Kaspar.** 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **64**:1390-1399.
282. **Shinagawa.** 1997. Correspondance and problem for Enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* **46**:104-112.
283. **Siegler, R. L.** 1994. Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* **125**:511-518.

284. **Simpkins, S. A., A. B. Chan, J. Hays, B. Popping, and N. Cook.** 2000. An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Lett Appl Microbiol* **30**:75-79.
285. **Smith, H. R., G. A. Willshaw, S. M. Scotland, A. Thomas, and B. Rowe.** 1993. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from human and non-human sources. *Zentralbl Bakteriol* **278**:436-44.
286. **Smith, H. R., B. Rowe, G. Adak, and W. Reilly.** 1998. Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. In : *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC : American Society for Microbiology, p. 49-58.
287. **Soloaga, A., M. P. Veiga, L. M. Garcia-Segura, H. Ostolaza, R. Brasseur, and F. M. Goni.** 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* **31**:1013-1024.
288. **Sperandio, V., J. B. Kaper, M. R. Bortolini, B. C. Neves, R. Keller, and L. R. Trabulsi.** 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.
289. **Stephan, R., and F. Untermann.** 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* **37**:1570-1572.
290. **Stevenson, J., and S. Hanson.** 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun Dis Rep CDR* **6**:116-118.
291. **Strachan, N. J., D. R. Fenlon, and I. D. Ogden.** 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* **203**:69-73.

292. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 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.
293. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**:1116-1122.
294. **Su, C., and L. J. Brandt.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* **123**:698-714.
295. **Suthienkul, O., J. E. Brown, J. Seriwatana, S. Tienthongdee, S. Sastravaha, and P. Echeverria.** 1990. Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol* **56**:1135-1139.
296. **Szabo, R. A., E. C. D. Todd, and A. Jean.** 1986. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. *J. Food Prot* **49**:768-772.
297. **Tamplin, M.** 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10 degrees C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *Journal of Food Protection* **65**:1535-1540.
298. **Tamplin, M. L., G. Paoli, B. S. Marmer, and J. Phillips.** 2005. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46 degrees C. *Int J Food Microbiol* **100**:335-344.
299. **Taormina, P. J., L. R. Beuchat, and L. Slutsker.** 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg Infect Dis* **5**:626-634.
300. **Tarr, P.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* **20**:1-8.

301. **Tarr, P., N. Tran, and R. Wilson.** 1999. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot* **62**:133-139.
302. **Tesh, V. L., J. E. Samuel, L. P. Perera, J. B. Sharefkin, and A. D. O'Brien.** 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.
303. **Thomas, A., H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe.** 1991. Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Vero cytotoxins VT1, VT2 and VT2 variant. *Mol Cell Probes* **5**:129-135.
304. **Thomas, A., H. R. Smith, and B. Rowe.** 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.
305. **Thomson, J. S., D. S. Hodge, and A. A. Borczyk.** 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* **28**:2165-2168.
306. **Thran, B. H., H. S. Hussein, M. R. Hall, and S. F. Khaiboullina.** 2001. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot* **64**:1613-1616.
307. **Tilden, J., Jr., W. Young, A. M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S. B. Werner, J. Hollingsworth, and J. G. Morris.** 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**:1142-1145.
308. **Toft, N., G. T. Innocent, D. J. Mellor, and S. W. Reid.** 2006. The Gamma-Poisson model as a statistical method to determine if micro-organisms are randomly distributed in a food matrix. *Food Microbiol* **23**:90-94.

309. **Uemura, R., M. Sueyoshi, M. Nagayoshi, and H. Nagatamo.** 2003. Antimicrobial susceptibilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from pigs with Edma disease in Japan. *Microbiol Immunol* **47**:57-61.
310. **Upton, P., and J. E. Coia.** 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* **344**:1015.
311. **Uyttendaele, M., C. Grangette, F. Rogerie, S. Pasteau, J. Debevere, and M. Lange.** 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.
312. **Van Gerwen, S. J., and M. H. Zwietering.** 1998. Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J Food Prot* **61**:1541-1549.
313. **Van Impe, J. F., F. Poschet, A. H. Geeraerd, and K. M. Vereecken.** 2005. Towards a novel class of predictive microbial growth models. *Int J Food Microbiol* **100**:97-105.
314. **Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi, and H. Nakanishi.** 1997. A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* **63**:4127-4131.
315. **Vernozy-Rozand C., and S. Ray-Gueniot.** 1997. *Escherichia coli* O157 :H7 et *Escherichia coli* Verotoxiques : Particularités physiologiques, biochimiques, méthodes d'isolement et de détection dans les aliments. *Rev Méd Vét* **148**:169-178.
316. **Vernozy-Rozand, C., and M. P. Montet.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
317. **Vernozy-Rozand, C., J. Bouvet, M. P. Montet, C. Bavai, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy-Cruchaudet, and Y. Richard.** 2002. Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in France. In 102th General Meeting of American Society for Microbiology May, 19-20 Salt-Lake City, USA.

318. **Vial, P. A., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine.** 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* **158**:70-79.
319. **Vold, L., A. Holck, Y. Wasteson, and H. Nissen.** 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* **56**:219-225.
320. **Wadolowski, E. A., L. M. Sung, J. A. Burris, J. E. Samuel, and A. D. O'Brien.** 1990. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* **58**:3959-3965.
321. **Wang, G., T. Zhao, and M. P. Doyle.** 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **62**:2567-2570.
322. **Wang, G., and M. P. Doyle.** 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* **61**:662-667.
323. **Ware, L. M., M. L. Kain, J. N. Sofos, K. E. Belk, and G. C. Smith.** 1999. Comparison of sponging and excising as sampling procedures for microbiological analysis of fresh beef-carcass tissue. *J Food Prot* **62**:1255-1259.
324. **Whiting, R., and M. Cygnarowicz-Provost.** 1992. A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food microbiology* **9**:269-277.
325. **Whiting, R. C., and L. K. Bagi.** 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**:291-295.
326. **Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Orskov, I. Orskov, and R. A. Wilson.** 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* **61**:1619-1629.

327. **Wieler, L. H., T. K. McDaniel, T. S. Whittam, and J. B. Kaper.** 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.
328. **Willshaw, G. A., H. R. Smith, D. Roberts, J. Thirlwell, T. Cheasty, and B. Rowe.** 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.
329. **Wilson, J. B., S. A. McEwen, R. C. Clarke, K. E. Leslie, R. A. Wilson, D. Waltner-Toews, and C. L. Gyles.** 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. Epidemiol Infect **108**:423-439.
330. **Wilson, J. B., S. A. Renwick, R. C. Clarke, K. Rahn, D. Alves, R. P. Johnson, A. G. Ellis, S. A. McEwen, M. A. Karmali, H. Lior, and J. Spika.** 1998. Risk factors for infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms. Prev Vet Med **34**:227-236.
331. **Zadik, P. M., P. A. Chapman, and C. A. Siddons.** 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J Med Microbiol **39**:155-158.
332. **Zhao, T., M. P. Doyle, and R. E. Besser.** 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl Environ Microbiol **59**:2526-2530.
333. **Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. Van 't Riet.** 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. Appl Environ Microbiol **56**:1875-1881.
334. **Zwietering, M., T. Wijtzes, J. D. Wit, and K Van't Riek.** 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in food. J Food Prot **55**:973-979.
335. **Zwietering, M. H., J. C. de Wit, and S. Notermans.** 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.

ABSTRACT

The Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) are an emerging cause of food-borne illness and have become a public health priority. Paradoxically, there is no European microbiological criteria for detecting STEC in foodstuffs.

The aim of our study is to investigate the current main protocols used for detecting STEC, in order to suggest new optimized protocols to the manufacturers, which could limit the risk of distributing contaminated foodstuffs. Thus, growth follow-up and modeling of the simultaneous growth of several STEC strains and the background microflora of different matrices were carried out in various enrichment conditions.

The present study shows that when the level of STEC contamination is low, a short enrichment step (e.g. 6 hours for the IMS protocol (ISO EN 16654)) is not sufficient to detect STEC and could lead to false-negative results. However in particular conditions, it is not useful to extend the duration of the enrichment step because a simple competition between the STEC and the background microflora stops the STEC growth. The STEC growth duration depends on the matrix analysed and on its density in background flora. The growth duration varies between 4 and 7h for bovine faecal samples, and from 10 and 12h for ground beef samples in our experiments. For milk samples, another kind of interaction stops the STEC growth before that of the background flora (from 8,5 to 11h in our experiments).

Selective ingredients are often added to enrichment broths in order to improve the growth of STEC by limiting the growth of background microflora. The use of bile salts in enrichment broths has a positive impact for detecting STEC from bovine faecal and milk samples, but has little effect for detecting STEC from ground beef. However, the addition of novobiocin into enrichment broths inhibits the growth of some non-O157:H7 STEC strains, and slows down the growth of some *E. coli* O157:H7 strains. In order to avoid false-negative results, we strongly suggest that novobiocin should not be systematically added into enrichment broths for detecting STEC from food.

Finally, an optimisation of the current French testing protocol is proposed to detect *E. coli* O157:H7 in ground beef [ISO 16140] with a higher sample size and a reduced testing duration, while maintaining accuracy and taking into account the industry work flow and its economic constraints.

TITLE

Optimization of the detection of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC)

KEYWORDS

E. coli O157:H7, STEC, Enrichment, Detection, Growth modelling, Bacterial interactions

RESEARCH LABORATORY

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 1,
Avenue Bourgelat – BP 83 – 69280 Marcy l'Etoile

RESUME

A l'heure actuelle, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme des pathogènes émergents importants en santé publique. Cependant, il n'existe aujourd'hui aucune réglementation officielle stipulant les procédures à suivre pour l'échantillonnage et la recherche des STEC dans les denrées alimentaires.

Ce travail a pour objectif d'étudier les différents protocoles utilisés pour la recherche des STEC, de manière à pouvoir proposer aux industriels des protocoles optimisés leur permettant une réelle maîtrise du « danger STEC » dans leur filière. Dans ce but, la cinétique de croissance de diverses souches de STEC a, dans différentes conditions d'enrichissement, été suivie simultanément à celle de la flore annexe de la matrice, puis modélisée.

Notre étude souligne qu'un enrichissement trop court, comme les 6 heures d'incubation dans le cas de l'IMS, peut conduire à l'obtention de résultats faussement négatifs. Il s'avère néanmoins inutile, dans certaines conditions, de prolonger l'étape d'enrichissement car une interaction de type compétition simple avec la flore annexe arrête la croissance des STEC. Cet arrêt est plus ou moins rapide selon la matrice analysée et sa densité en flore annexe naturelle (de 4 à 7 h pour les fèces et de 10 à 12 h pour le steak haché dans nos expérimentations). Dans le lait, des interactions plus complexes entraînent un arrêt de la croissance des STEC avant celui de la flore naturelle (8,5 à 11 h dans nos expérimentations).

L'utilisation d'agents sélectifs a pour but de freiner la croissance de la flore annexe, ce qui peut avoir pour impact de prolonger la croissance des STEC. L'ajout de sels biliaires dans le milieu d'enrichissement a un effet positif dans le cas de l'enrichissement d'échantillons de fèces de bovins et de lait cru mais n'a pas d'effet significatif pour la matrice « steak haché ». En revanche, l'addition de novobiocine dans le milieu peut inhiber certaines souches de STEC non-O157:H7 et ralentir la croissance de *E. coli* O157:H7. L'usage de cet antibiotique, potentiellement responsable de résultats faussement négatifs, devrait être abandonné.

Par ailleurs, cette étude a permis d'optimiser le protocole de recherche de *E. coli* O157:H7 dans le steak haché (ISO 16140) en validant, d'une part, l'analyse d'une plus grosse masse d'échantillon dans un même volume de milieu (ratio plus élevé) et en réduisant, d'autre part, le temps d'analyse grâce à l'utilisation d'une température d'incubation plus élevée de 41,5°C.

Discipline : Diplôme de Doctorat d'Université

Mots clés : *E. coli* O157:H7, STEC, Enrichissement, Détection, Modélisation de la croissance, Interactions bactériennes

Laboratoire de recherche : Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – 1, Avenue Bourgelat – BP 83 – 69280 Marcy l'Etoile