



HAL
open science

Croissance et survie des *Escherichia Coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) en fonction des technologies fromagères mettant en oeuvre du lait cru

Stéphane Dimitri Mischczycha

► To cite this version:

Stéphane Dimitri Mischczycha. Croissance et survie des *Escherichia Coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) en fonction des technologies fromagères mettant en oeuvre du lait cru. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22349 . tel-00874866

HAL Id: tel-00874866

<https://theses.hal.science/tel-00874866>

Submitted on 18 Oct 2013

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.

ECOLE DOCTORALE
Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

N° Ordre : 611

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et génétique moléculaires)

soutenue le 15 Avril 2013

Par Stéphane Dimitri MISZCZYCHA

Croissance et survie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga
Toxines (STEC) en fonction des technologies fromagères
mettant en œuvre du lait cru.

Thèse dirigée par : Dr. Marie-Christine MONTEL et Dr. Delphine THEVENOT-SERGENTET

Président : M. Gérard FONTY, Directeur de Recherche émérite, CNRS-Université Blaise Pascal
Rapporteurs : M. Emmanuel COTON, Professeur, Université de Bretagne Occidentale
M. Hubert BRUGERE, Maître de Conférences, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Membre : Mme Marie-Christine MONTEL, Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand
Invitées : Mme Stéphanie BLANQUET-DIOT, Maître de Conférences, Université d'Auvergne
Mme Delphine THEVENOT-SERGENTET, Maître de Conférences, VetAgro-Sup, Lyon
Mme Choreh FARROKH, responsable du service sécurité sanitaire du CNIEL, Paris

UR 2011.03.100 « Consommateur-Aliments Typiques-Sécurité Santé »
VetAgro-Sup, campus Vétérinaire de Lyon

Remerciements :

Aux membres du jury,

A Monsieur le Docteur Gérard Fonty, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Qu'il reçoive ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma gratitude.

A Madame le Docteur Marie-Christine Montel, directrice de thèse à qui je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements pour avoir accepté d'encadrer ma thèse, pour son soutien sans faille au cours de ces 3 années, pour tous les précieux conseils qu'elle a pu m'apporter et sans qui ce travail n'aurait pu être.

A Madame le Docteur Delphine Thevenot-Sergentet, co-directrice de thèse que je tiens à remercier plus particulièrement pour toute la confiance qu'elle m'a accordé, tous ses conseils, sa patience, sa disponibilité et sa motivation qui ont été les fers de lance de ce travail.

A Monsieur le Professeur Emmanuel Coton et Monsieur le Docteur Hubert Brugère, que je tiens à remercier pour avoir accepté de juger ce travail en la qualité de rapporteurs. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour le temps consacré à l'étude de ces travaux et pour l'intérêt porté à cette thèse. Votre participation à mon jury de thèse est pour moi un plaisir ainsi qu'un grand honneur.

A Madame le Docteur Stéphanie Blanquet-Diot, que je tiens à remercier pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse ainsi que pour son aide, ses conseils et son implication dans ce projet de thèse.

A Madame le Docteur Choreh Farrokh que je tiens à remercier pour son encadrement au sein du CNIEL, ses précieux conseils, sa patience ainsi que sa gentillesse et sa disponibilité qui ont permis de guider ce travail.

« C'est à celui qui domine sur les esprits par la force de la vérité, non à ceux qui font les esclaves par la violence, que nous devons nos respects. »

Voltaire

« Pour atteindre la vérité, il faut une fois dans la vie se défaire de toutes les opinions qu'on a reçues, et reconstruire de nouveau tout le système de ses connaissances. »

René Descartes

Je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements à tous les membres (et les anciens !) de l'équipe EMSA, de l'ancienne UMAP à l'actuel LMAP.

Merci à toi, « chef » Delphine pour toute ta patience au cours de ces 5 années au sein de ce laboratoire. On a toujours su se faire confiance, camper sur nos positions quand cela était nécessaire (voire même « s'engueuler » !), mais nous avons aussi su nous remettre en question et progresser. Sans toi tout ce travail n'aurait pas pu avoir lieu, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi ! « Keep the spirit » !!! ;-)

Je tiens aussi à remercier Christine Rozand. Sans toi, rien de cela n'aurait pu avoir lieu, j'avais même quasiment abandonné l'idée d'une carrière scientifique après mes 3 années d'errance professionnelle. Tu as accepté de m'embaucher comme ingénieur, de me faire confiance et de me proposer d'effectuer une thèse. Sache que je t'en serai toujours reconnaissant.

Au sein de l'équipe, je tiens à exprimer ma plus grande gratitude à Sarah ! Certes, au début ça n'avait pas été facile, quand ton vite et bien s'est heurté à mon lentement mais sûrement, mais nous avons su travailler ensemble et même devenir la redoutable « équipe de choc fromagère » du labo !!! Sans ton aide, ta gentillesse, tes conseils avisés et ta motivation sans faille, je ne sais pas comment j'aurai pu m'en sortir ! Encore merci à toi !!! :-)

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du labo pour leur soutien et pour parvenir à supporter toutes mes (nombreuses) excentricités ! Un grand merci en particulier à Marion, Audrey, Christine, Cécile, Aurélie, Françoise, Estelle, Virginie, Franck, Stéphane, Jérémy, Patrice (notre Patou, on t'aime !) pour (dans le désordre !), nos conversations philosophiques, scientifiques, gastronomiques, qualité (et oui !) et botaniques, tous nos délires au laboratoire, m'avoir surnommé StephOne plus (mais pas d'Applied Biosystems), tous les moments difficiles qu'on a su traverser et surmonter ensemble, nos repas de labo où l'on mange pour 10 avec des plats à faire pleurer des chefs étoilés, votre patience, votre gentillesse, votre amitié et tous les conseils que vous avez pu m'apporter au cours de ces nombreuses années ! J'espère en retour avoir été à la hauteur de la confiance et du respect que vous m'avez témoigné ! Une pensée aussi à tous les anciens du laboratoire (Christine B, Lysiane, Fanny, Anthony, Paul, Manue...), je vous remercie pour tout ce que vous avez pu m'apporter !

Je remercie toutes les personnes du campus Vétérinaire de Lyon mais aussi du campus Agronomique de Clermont de VetAgro-Sup avec qui j'ai pu travailler ou tout simplement papoter, et tout particulièrement Marie-Laure Delignette-Muller, Isabelle Chevalier, Karine

Fayolle et Françoise Leriche ainsi que l'équipe d'enseignement QSA, Sylvie Mialet, Alain Gonthier et Pierre-Olivier Demont, sans oublier un énorme merci à Bob et Valérie, car sans vous, rien de tout cela n'aurait pu se faire !!!

Je tiens aussi exprimer mes remerciements à mes collègues de l'Unité de Recherches Fromagères d'Aurillac. Je remercie très chaleureusement Marie-Christine Montel pour m'avoir accueilli au sein de l'URF et de m'avoir encadré au cours de ma thèse ! J'ai énormément appris grâce à toi et je te remercie pour tous tes conseils et ta gentillesse ainsi que pour les fameux macarons de Massiac que tu m'as fait découvrir ! Un grand merci à René Lavigne et Robert Didienne, je n'oublierai jamais nos fabrications de fromages ! Un merci aussi à tout le personnel de l'URF et particulièrement à Céline Delbès et à Cécile Callon.

Je remercie aussi tous mes collègues de Clermont-Ferrand de l'ERT CIDAM et tout particulièrement Monique Alric, Stéphanie Blanquet-Diot, Jonathan Thevenot, Sylvain Denis, Lucie Etienne-Mesmin et Sandrine Chalancon pour m'avoir accueilli et fait partager leurs connaissances pendant près d'un mois pour digérer nos fromages ! Je tiens aussi à remercier Valérie Livrelli et Christine Martin ; j'ai eu en de nombreuses occasions le plaisir de pouvoir discuter et travailler avec vous, chacun de nos échanges ont toujours été extrêmement enrichissants pour moi.

Pour finir, je tiens à remercier tous mes collègues du CNIEL et d'Actilait pour avoir participer à ce projet. Plus particulièrement, je tiens à adresser un grand merci à Choreh Farrokh pour m'avoir encadré et avoir toujours été là pour répondre à mes (nombreuses) questions. Travailler avec toi a été un réel plaisir ! Je remercie aussi Emmanuel Jamet pour tous ses conseils et la pertinence de ses avis qui ont été d'une aide précieuse au cours de ce travail. Je remercie aussi Fanny Tenenhaus-Aziza et Frédérique Perrin pour leur aide en statistique et leur contribution à ce projet et un grand merci aux documentalistes, Sylvie Moussiégt et Danyel Lesage !

Enfin, j'adresse un grand merci à tous les professionnels de la filière laitière et fromagère. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans votre soutien et il est le témoin de l'engagement de votre filière dans la lutte contre les STEC. J'espère sincèrement avoir répondu à vos attentes et honoré la confiance que vous que vous m'avez accordée.

Je dédicace cette thèse...

A ma Delphine sans qui ma vie n'aurait pas de sens. Il m'a fallu presque trente longues années pour te trouver et désormais rien ne nous séparera. Tu es la femme de ma vie, mon rayon de Soleil et tu me donnes chaque jour la force d'aller de l'avant et de surmonter tous les obstacles de la vie. Merci pour tout mon amour !!! :-)

A mes parents, Danièle et Roland, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible ! Malgré tous les coups durs de la vie, nous avons su rester uni et surmonter les difficultés. Vous avez toujours cru en moi et je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci encore à vous deux !!! ;-)

A Fabien (« le Gros Bâtard ») et Gilles (« le Maître »), vous qui êtes comme mes frères ! Sans vous, jamais je n'aurais été l'être que je suis aujourd'hui !!! ;-)

A tous mes amis, en particulier à David mon « Louveteau de l'espace préféré » et Yann, mais aussi à tous mes collègues du labo qui sont aussi devenu mes amis. Merci d'être là et de m'apporter votre amitié et votre soutien.

A ma famille, qui, malgré son éparpillement aux quatre coins de la France et de l'Europe, sait rester soudée et m'a toujours apporté son soutien et son aide.

A ma belle-famille, merci de m'avoir adopté comme un des vôtres et de me soutenir !

Merci à vous toutes et vous tous !!!

Je tiens à mon tour à vous dédicacer ces quelques citations (que seulement certains d'entre vous comprendrons, mais cela n'est pas grave !) :

« Phiiiiipe » - *Anonyme*.

« I'll be back » - *Arnold Schwarzenegger*.

« Moi mes pieds, j'les mets où je veux... et c'est souvent dans la gueule !!! » - *Chuck Norris*.

« La maturité de l'homme, c'est d'avoir retrouvé le sérieux qu'on avait au jeu quand on était enfant. »

Friedrich Nietzsche

« L'homme est une chose imparfaite qui tend sans cesse à quelque chose de meilleur et de plus grand qu'elle-même. »

René Descartes

Résumé :

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des bactéries pathogènes originaires du tractus digestif des ruminants qui peuvent contaminer certains aliments. Une fois ingérés, ils peuvent provoquer des pathologies graves.

Le comportement des STEC n'appartenant pas au sérotype O157:H7 dans les fromages était mal connu. Par ailleurs, en dépit d'une forte prévalence des STEC dans les fromages, cet aliment est moins impliqué dans les épidémies que la viande. C'est pourquoi nous avons étudié dans un premier temps le devenir de ces STEC au cours de la fabrication de 5 schémas technologiques de fromages différents. Dans un deuxième temps, nous avons analysé le comportement et la survie de STEC ayant survécu à la fabrication d'un fromage au cours d'une digestion artificielle.

Nos résultats ont montré que certaines technologies sont favorables à la croissance des STEC. Seul un affinage de plus de 60 jours a permis une réduction du taux des STEC. Les étapes de cuisson du caillé ou de coagulation longue de certaines technologies semblent inhiber la croissance des STEC. De plus, la croissance et la survie observées pour les souches *E. coli* O157:H7 étaient plus faibles que pour les souches *E. coli* non-O157:H7. L'étude de la survie des souches STEC au cours de la digestion artificielle a montré une différence de comportement entre les 2 souches STEC testées : la souche *E. coli* O157:H7 a survécu à la digestion tandis que celle de sérotype O26:H11 s'est fortement développée en fin de digestion.

Mots clefs : STEC, fromages au lait cru, comportement, digestion.

Laboratoire d'accueil : Unité CALITYSS, Equipe EMSA, LMAP/LNR STEC VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile

Title : Growth and Survival of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in Raw Milk Cheeses.

Abstract :

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important cause of foodborne illness. They are originated from the digestive tract of the ruminants and can contaminate certain food. Once ingested, they can be responsible for a variety of clinical outcomes.

To date, most authors have focused their work on the behavior of *E. coli* O157:H7 during cheese manufacturing: little is known about the behavior of non-O157:H7 STEC. Furthermore, the presence of STEC strains has been found in raw milk cheeses but dairy products remain less implicated in outbreaks than meat. Consequently, we chose to study the behavior of O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains during the manufacturing of 5 different cheese technologies. Then, secondly, it appeared interesting to evaluate the survival of STEC isolated from cheeses during artificial digestion.

Our results showed that certain technologies are favorable to the growth of the STEC. Only a long ripening step (>60 days) could then allow a reduction of the STEC rate. In contrast, the cooking step of the curd or the long coagulation of certain technologies inhibited their growth. Our results also showed that the growth and the survival of the *E. coli* O157:H7 strains were lower than those of the non-O157:H7 *E. coli* strains.

The study of the survival of STEC strains during the artificial digestion highlighted an important difference of behavior for the 2 strains tested: the *E. coli* O157:H7 strain was able only to survive whereas the *E. coli* O26:H11 strain knew an important growth at the end of digestion.

Keywords : STEC, raw milk cheeses, behavior, digestion.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	3
<i>Résumé</i>	10
<i>Abstract</i>	11
<i>Liste des tableaux</i>	16
<i>Liste des figures</i>	17
<i>Liste des abréviations</i>	19
INTRODUCTION	20
<i>Avant propos</i>	21
<i>Axes d'études</i>	23
MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE	25
CHAPITRE 1. GENERALITES RELATIVES AUX <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)	26
1. <i>Données taxonomiques</i>	26
1.1. L'espèce <i>Escherichia coli</i>	26
1.2. Classification des <i>Escherichia coli</i> en sérogroupes et en sérotypes	27
1.3. Les antigènes somatiques	28
1.4. Les antigènes flagellaires	29
1.5. Classification médicales en pathotypes des <i>E. coli</i> responsables de troubles intestinaux	29
2. <i>Les STEC pathogènes</i>	33
2.1. Définition de l'ANSES	33
2.2. Pathogénicité	35
2.3. Les facteurs de virulence des STEC	35
2.4. Définition française du STEC pathogène	51
3. <i>Aspect clinique et symptômes liés aux EHEC</i>	51
3.1. La colite hémorragique	52
3.2. Le SHU	52
3.3. Le PTT	54
4. <i>Epidémiologie</i>	55
4.1. Le réservoir animal	56
4.2. Les modes de transmission	57
4.3. Principales épidémies	60
5. <i>Recherche d'<i>E. coli</i> O157:H7 et des STEC dans les aliments</i>	66
5.1. L'enrichissement des matrices alimentaires	70
5.2. Détection des STEC	72
5.3. L'étape de confirmation	74
5.4. Les différents milieux d'isolement	74
5.5. Confirmation du sérotype et des facteurs de virulence de la souche	76
<i>Points clefs</i>	77
CHAPITRE 2. STEC ET PRODUITS LAITIERS	79
1. <i>Excrétions des STEC par les ruminants laitiers</i>	79
2. <i>Sources et circulation des STEC dans les fermes</i>	82
2.1. <i>Survie dans les fèces</i>	83
	12

2.2. Survie des STEC dans la ferme.....	83
2.3. Survie des STEC dans l'alimentation des ruminants	84
2.4. Survie des STEC dans les nappes phréatiques et le sol	85
3. <i>Prévalence des STEC dans les produits laitiers</i>	86
3.1. Prévalence des STEC dans le lait cru	86
3.2. Prévalence des STEC dans les fromages et autres produits laitiers.....	87
4. <i>Epidémies liées à la présence de STEC dans les produits laitiers</i>	89
5. <i>Mesures de prévention des contaminations du lait et des produits laitiers</i>	91
5.1. Intervention en amont de la traite.....	91
5.2. Intervention en aval de la traite.....	93
5.3. Risques de persistance des souches sous forme de biofilms.....	94
6. <i>La technologie fromagère</i>	95
6.1. Généralités sur la technologie fromagère.....	96
6.2. Principales étapes de la fabrication du fromage.....	99
6.3. Facteurs intrinsèques ayant un impact sur les STEC au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage	101
6.4. Facteurs environnementaux ayant un impact sur les STEC au cours de la fabrication et l'affinage du fromage	107
6.5. Conclusion	109
7. <i>Comportement des STEC au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages</i> ...	110
8. <i>Comportement au cours de la digestion</i>	113
<i>Points clefs</i>	114
<i>Valorisation</i>	115
<i>Conclusion du mémoire bibliographique</i>	116

MEMOIRE EXPERIMENTAL117

CHAPITRE 3. ETUDE DU COMPORTEMENT DE DIFFERENTS SEROTYPES DE STEC DANS LES MATRICES FROMAGERES A BASE DE LAIT CRU 119

1. <i>Introduction</i>	119
2. <i>Matériel et méthodes</i>	121
2.1. Souches bactériennes.....	121
2.2. Inoculation.....	121
2.3. Fabrication des fromages	124
2.4. Analyse physico-chimique	124
2.5. Echantillonnage, dénombrement et détection des souches STEC	125
2.6. Confirmation et caractérisation des bactéries par PCR en temps réel	127
2.7. Analyses statistiques	128
3. <i>Résultats</i>	129
3.1. Fromage de type Pâte Persillée (PP – lait cru de brebis)	129
3.2. Fromage de type Pâte Pressée Non-Cuite avec un Affinage Long (PPNC1-AL – lait de vache)	130
3.3. Fromage de type Pâte Pressée Non-Cuite avec un Affinage Court (PPNC2-AR – lait de vache)	131
3.4. Fromage de type Pâte Pressée Cuite (PPC- lait cru de vache)	134
3.5. Fromage de type Lactique Chèvre (LC – lait de chèvre).....	135
3.6. Recherche de la présence du gène <i>stx</i> en fin d'affinage pour les fromages de type Pâte Persillée	136

4. Discussion.....	137
4.1. Facteurs inhibant la croissance des STEC.....	137
4.2. Facteurs permettant une augmentation du taux de STEC.....	138
4.3. Facteurs permettant une diminution du taux de STEC au cours de l’affinage	139
4.4. Effet sérotype	141
4.5. Présence du gène <i>stx</i> en fin d’affinage	142
5. Conclusion	142
6. Valorisation	144
6.1. Publication.....	144
6.2. Communications orales.....	144
6.3. Posters.....	145
CHAPITRE 4. ETUDE DU COMPORTEMENT DE SOUCHES STEC APPARTENANT AU SEROTYPE O26:H11 ET AU SEROTYPE O157:H7 AYANT SURVECU AU PROCESSUS DE FABRICATION FROMAGER AU COURS D’UNE DIGESTION ARTIFICIELLE.	147
1. Introduction.....	147
2. Matériel et méthodes.....	148
2.1. Souches bactériennes.....	148
2.2. Inoculation.....	151
2.3. Fabrication des fromages	151
2.4. Digestion artificielle par le TIM	152
2.5. Analyse du bleu dextran.....	153
2.6. Echantillonnage	153
2.7. Dénombrement et détection des STEC.....	154
2.8. Confirmation et caractérisation des bactéries par PCR en temps réel	156
2.9. Analyses microbiologiques	157
2.10. Analyse physico-chimique	158
2.11. Expression des Shiga-toxines	158
2.12. Analyses statistiques	159
3. Résultats.....	160
3.1. Acido résistance	160
3.2. Flores microbiennes des fromages	160
3.3. Caractéristiques physico-chimiques.....	161
3.4. Digestion artificielle dans le TIM	161
3.5. Expression des Shiga-toxines	165
4. Discussion.....	167
4.1. Comportement des différentes microflore dans le fromage	167
4.2. Evolution des STEC au cours de la digestion	168
4.3. Evolution des autres flores microbiennes au cours de la digestion	170
4.4. Effet sérotype	170
4.5. Expression des Shiga-toxines	173
5. Conclusion	173
6. Valorisation	175
DISCUSSION ET CONCLUSION	176
1. Croissance et survie des STEC dans les fromages à base de lait cru	177
1.1. Impact des facteurs physico-chimiques	177
1.2. Effet sérotype	178

1.3. Retombées pour les filières fromagères	179
2. <i>Survie au cours de la digestion</i>	181
2.1. Comportement des STEC au cours de la digestion artificielle	182
2.2. Pathogénicité ?	183
2.3. Perspectives.....	184
3. <i>Conclusion générale</i>	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186
ANNEXES	230
ANNEXE 1 - TRAVAUX SUR LA PRESENCE DES STEC ET LA PREVALENCE DES GENES <i>STX</i> DANS LE LAIT CRU (FARROKH <i>ET AL.</i>, 2012).	231
ANNEXE 2 - TRAVAUX SUR LA PRESENCE DES STEC ET LA PREVALENCE DES GENES <i>STX</i> DANS LES FROMAGES ET AUTRES PRODUITS LAITIERS DIFFERENTS DU LAIT (FARROKH <i>ET AL.</i>, 2012).	239
ANNEXE 3 - EPIDEMIES PROVOQUEES PAR LES STEC IMPLIQUANT LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS (FARROKH <i>ET AL.</i>, 2012).	244
ANNEXE 4 – PUBLICATION 1.	252
ANNEXE 5 – PUBLICATION 2.	276
ANNEXE 6 - COMMUNICATIONS ORALES.	286
ANNEXE 7 – POSTER 1.	289
ANNEXE 8 - POSTER 2.	291
ANNEXE 9 – PUBLICATION 3.	293
ANNEXE 10 – PUBLICATION 4.	316

Liste des tableaux :

Tableau 1. Principaux caractères permettant la différenciation des espèces du genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. hermanii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i>).	27
Tableau 2. Classification des sérotypes de STEC en séropathotype (Karmali <i>et al.</i> , 2003). ...	34
Tableau 3. Résumés des mécanismes de résistance à l'acidité (Peng <i>et al.</i> , 2011 ; Zhao & Houry, 2010).	48
Tableau 4. Principales épidémies dues aux STEC dans le monde depuis 1982.	60
Tableau 5. Prévalence des différents sérogroupes de EHEC impliqués dans les cas de SHU en France.....	64
Tableau 6. pH des gels en fonction du type de coagulation (Ramet, 1985).	101
Tableau 7. Teneur en sel de quelques fromages (Mahaut <i>et al.</i> , 2000).....	104
Tableau 8. Souches utilisées lors de cette étude.	123
Tableau 9. Présence du gène <i>stx</i> sur les souches isolées en fin d'affinage et au cours de la conservation du fromage de type pâte persillée.....	136
Tableau 10. Souches utilisées au cours de l'expérimentation digesteur.....	150
Tableau 11. Points de prélèvements : TIM.....	155

Liste des figures :

Figure 1. Pathogénie associée aux six classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées (Nataro & Kaper, 1998).....	30
Figure 2. Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d' <i>E. coli</i> (Naylor <i>et al.</i> , 2005). Les surfaces des disques et intersections ne sont pas proportionnelles à la prévalence des différents types d' <i>E. coli</i>	33
Figure 3. Trafic intra-cellulaire de la Shiga toxine (Johannes & Römer, 2010).	37
Figure 4. Schéma représentant les différences entre cycle lytique et cycle lysogénique des phages de type lambda (Online Textbook of Bacteriology, Kenneth Todar, www.textbookofbacteriology.net).....	39
Figure 5. Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes. Les couleurs des flèches indiquent la fonction des gènes correspondants (Garmendia <i>et al.</i> , 2005).	41
Figure 6. Répartitions des gènes nle sur les différents îlots de pathogénicités (Coombes <i>et al.</i> , 2008).	45
Figure 7. Systèmes d'acido-résistance dépendant d'acides aminés chez <i>E. coli</i> (Zhao & Houry, 2010).	47
Figure 8. Mécanismes de résistance à l'acidité rencontrée dans l'estomac (Hong <i>et al.</i> , 2012).	50
Figure 9. Evolutions cliniques après ingestion de souches EHEC (Tarr <i>et al.</i> , 2005).	54
Figure 10. Flux potentiels des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme (AFSSA, 2003).	57
Figure 11. Prévalence des différents sérogroupes de EHEC impliqués dans des cas de SHU en Italie (Scavia <i>et al.</i> , 2012).	64
Figure 12. Protocole simplifié de recherche des STEC.....	67
Figure 13. Diagramme simplifié représentant la procédure de recherches des STEC selon la norme ISO-TS 13136.	70
Figure 14. Les grandes étapes de la fabrication fromagère.	98

Figure 15. Diagramme présentant les caractéristiques des différents types de fromages testés.....	126
Figure 16. Moyennes des résultats de dénombrement des différents serotypes de STEC testés tout au long de la fabrication, de l’affinage et de la conservation des différents types de fromages. La fin des technologies plus courtes a été indiquée afin de visualiser plus distinctement l’impact de la durée d’affinage sur la survie des STEC. Les barres verticales représentent les valeurs minimales et maximales obtenues pour chaque sérotype lors des dénombrements.....	132
Figure 17. Evolution des valeurs de pH (moyennes) au cours des premières de fabrication et au cours de l’affinage et de la conservation des fromages.	133
Figure 18. Diagramme présentant les 2 séries d’expériences réalisées lors de l’expérimentation digesteur.....	150
Figure 19. Moyennes des niveaux des STEC ainsi que des autres populations microbiennes au cours des expérimentations A et B.	162
Figure 20. Taux de survie des souches STEC au cours de la digestion artificielle dans les différents compartiments du TIM ainsi qu’au niveau des sorties iléales (SIC).....	164
Figure 21. Taux de survie des microflores fromagères au cours de la digestion artificielle par le TIM au niveau des sorties iléales.....	166

Liste des abréviations :

AAFs	« <i>aggregative adherence fimbriae</i> »	GrlA	« <i>global regulator of LEE activator</i> »
A/E	attachement/effacement (lésion d')	IMS	« <i>Immuno Separation Magnetic</i> »
AEEC	Attaching and Effacing <i>E. coli</i>	InVs	Institut de Veille Sanitaire
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments	ISO	« <i>International Standard Organization</i> »
ANSES	Agence nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail	LEE	« <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> »
AOP	Appellation d'Origine Protégée	Ler	« <i>LEE encoded regulator</i> »
Bfp	« <i>bundle-forming pili</i> »	LC	Fromage de type lactique chèvre
Cif	« <i>cycle inhibiting factor</i> »	LPS	lipopolysaccharide
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière	Map	« <i>mitochondrion-associated protein</i> »
Ct	« <i>threshold cycle</i> »	PP	Fromage de type pâte persillée
CT	« <i>cefixim-tellurite</i> »	PPC	Fromage de type pâte pressée cuite
DAEC	<i>Diffuse-adhering E. coli</i>	PPNC	Fromage de type pâte pressée non-cuite
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation	PPNC1	Fromage de type pâte pressée non-cuite à affinage long
<i>eae</i>	« <i>E. coli</i> attaching and effacing » : gène codant pour l'intimine	-AL	
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i>	PPNC2	Fromage de type pâte pressée non-cuite à affinage court
EAF	« <i>EPEC adhesion factor</i> »	-AC	
EAHEC	« <i>Enteraggregative Hemorrhagic E. coli</i> »	PTT	Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
EAST1	« <i>EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1</i> »	Nle	« <i>non LEE-encoded effector</i> »
EFSA	« <i>European Food Safety Authority</i> »	NM	souche non mobile
EHEC	« <i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> »	PCR	« <i>Polymerase Chain Reaction</i> »
E-hlyA	Entérohémolysine	pH	potentiel hydrogène
<i>ehx</i>	<i>E-hly</i> : gène codant pour l'entérohémolysine des EHEC	<i>rfb</i>	« <i>O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region</i> »
EFSA	« <i>European Food Safety Authority</i> »	<i>saa</i>	« <i>STEC autoagglutining adhesin</i> »
EIEC	« <i>Enteroinvasive E. coli</i> »	ShET1	« <i>Shigella enterotoxin 1</i> »
ELISA	« <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> »	SHU	Syndromes Hémolytiques et Urémiques
EPEC	« <i>Enteropathogenic E. coli</i> »	STEC	« <i>Shiga-toxines producing E. coli</i> »
EPT	Eau Peptonnée Tamponnée	SubAB	« <i>subtilase cytotoxin</i> »
<i>esp</i>	« <i>EPEC secreted protein</i> »	<i>stx</i>	gène codant pour la Shiga-toxine
ETEC	« <i>Enterotoxigenic E. coli</i> »	TccP	« <i>tir cytoskeleton coupling protein</i> »
Gb3	Globotriosoylecéramide	TIM	« <i>TNO gastro-Intestinal Models</i> »
Gb4	Globotétraosylecéramide	Tir	« <i>translocated intimin receptor</i> »
		TNF	« <i>tumor necrosis factor</i> »

Introduction

Avant propos

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents, associés à des épidémies alimentaires parfois de grande envergure et souvent gravissimes depuis les années 1980. L'atteinte de l'homme se traduit par des pathologies sérieuses, surtout chez les enfants de moins de 3 ans, avec des développements de colite hémorragique et/ou de syndrome hémolytique et urémique (SHU) pouvant entraîner des lésions rénales parfois mortelles. Les personnes de plus de 60 ans sont aussi considérées comme une population à risque.

Le réservoir naturel des STEC est constitué d'animaux porteurs sains, et correspond plus particulièrement au tube digestif des ruminants (essentiellement les bovins, mais aussi les ovins et les caprins). La contamination des aliments ainsi que de l'eau est la plupart du temps liée à une contamination fécale. Elle peut avoir lieu à l'abattoir lorsque l'hygiène de l'abattage n'est pas maîtrisée (notamment lors des étapes de dépouillement, d'élimination du cuir et de l'éviscération). Elle peut également être liée à une mauvaise hygiène de la traite. Enfin, les végétaux peuvent être contaminés par des effluents tels que les substances d'épandages ou de l'eau contaminée par des déjections animales (AFSSA, 2003).

Les épidémies liées aux STEC ont surtout mis en cause de la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, mais également des produits laitiers. Le lait cru a rarement été associé à des épidémies humaines ; cependant, les fromages au lait cru ont été impliqués dans des cas sporadiques ou des épidémies (Baylis, 2009 ; Cloarec *et al.*, 1996 ; Farrokh *et al.*, 2012). En France, en novembre 2005, une épidémie impliquant du fromage au lait cru de type « Camembert » produit dans la région Normandie et contaminé par *E. coli* O26 est survenue (Espié *et al.*, 2006c). Quelques mois avant, des cas groupés de SHU au sein d'une même famille ayant consommé du fromage au lait cru de chèvre contaminé par *E. coli* O157 avaient été identifiés (Espié *et al.*, 2006a). De l'eau, des végétaux comme des laitues, des pousses de radis, des jus de fruits ont également été incriminés dans des épidémies (Karmali *et al.*, 2010). Très récemment, une épidémie de très grande envergure a été décrite en

Allemagne. Elle impliquait une souche d'*E. coli* O104:H4 présente dans des graines germées (Beutin & Martin, 2012 ; www.invs.sante.fr).

Les fromages au lait cru sont des produits à forte valeur ajoutée. Depuis la préhistoire, le fromage est présent dans notre alimentation. Cet aliment est apparu en même temps que l'élevage, à l'époque Néolithique, c'est-à-dire 7000 ans avant J.C. Initialement conçu afin de préserver les vertus du lait, le fromage apparaît aujourd'hui comme un acte de civilisation et de développement humain. L'ancrage de la tradition fromagère en France est fort puisque le pays compte plus de 90 000 exploitations laitières et 3 000 producteurs de fromages qui ont tous un savoir-faire propre. En aval de la filière, les lieux où se déroule l'affinage des fromages témoignent aussi du patrimoine culturel. La production fromagère traditionnelle est donc un élément important du tissu économique et social des régions: elle s'inscrit dans une dynamique de développement rural et d'aménagement du territoire, elle évite la désertification de certaines zones en fournissant une source de revenus non négligeable aux agriculteurs et est aussi un atout touristique indéniable.

En France, la production de fromage à base de lait de vache a atteint 1,8 millions de tonnes en 2011, 55826 tonnes pour ce qui concerne les fromages au lait de brebis et 93478 tonnes pour les fromages à base de lait de chèvre. Pour l'année 2011, 37,2% du lait collecté en France a été utilisé pour la fabrication de fromage. A l'échelle de l'Union Européenne, la production globale de fromage a atteint 8,9 millions de tonnes en 2010 tandis qu'au niveau mondial, elle atteint 20,8 millions de tonnes pour cette même année (CNIEL, 2012).

La consommation moyenne de fromages en UE est la plus importante au monde, avec, en 2010, une consommation moyenne de 17kg de fromage par habitant. Celle-ci a atteint 25,6kg pour la France, classant notre pays comme l'un des principaux consommateurs de fromage en UE et même au niveau mondial (la France est devancée par la Grèce - 30,9kg, et le Luxembourg - 26,7kg).

La consommation de fromage en France depuis 10 ans a peu évolué, puisqu'elle est passée de 24,1 kg (2000) à 25,6kg (2011) par personne et par an.

La production de fromages au lait cru, tout type de lait confondu, représente 181351 tonnes : plus d'un fromage sur 10 en France en 2010 est à base de lait cru. En France, de

nombreux fromages possèdent une AOP (Appellation d'Origine Protégée), dont 28 au lait de vache, 14 au lait de chèvre, 3 au lait de brebis. Outre ces fromages labélisés, rappelons qu'un grand nombre de fromages au lait cru existent en France et qu'ils représentent un important tonnage. En 2010, la production de fromages AOP en France était de 186471 tonnes. Certaines de ces appellations sont exclusivement au lait cru (Roquefort, Salers, Comté...), d'autres enfin peuvent utiliser du lait cru ou du lait pasteurisé (Cantal...).

Tous ces chiffres soulignent l'importance économique et donc sociale de la production fromagère en France. Une épidémie provoquée par des STEC suite à la consommation de fromage aurait nécessairement des retombées économiques lourdes sur toute la filière (lait pasteurisé aussi bien que lait cru), avec des conséquences directes sur l'emploi qui, en cette période de crise économique, seraient dramatiques.

Il est important de souligner que les connaissances relatives au comportement des STEC issus de produits fromagers au cours de la digestion sont rares voire inexistantes. Or, ces bactéries doivent être ingérées pour causer des pathologies chez l'être humain. Les différentes étapes de la fabrication fromagère pourraient influencer le comportement des STEC au moment de la digestion et ainsi affecter leur pathogénicité.

Par conséquent, la maîtrise de ce pathogène de la production de lait jusqu'aux fromages affinés et une meilleure connaissance de sa pathogénicité sont des enjeux majeurs tant du point de vue de la santé publique que du maintien de l'activité économique de certaines régions.

Axes d'études

Deux grandes questions ont motivé ce projet :

- Comment se comportent les souches STEC O157:H7 et non-O157:H7 au cours de la fabrication de fromages au lait cru en fonction de différents schémas technologiques?
- Si un fromage au lait cru est contaminé par des STEC et ingéré par un consommateur, quel sera le devenir des STEC au cours de la digestion ?

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 sera consacrée dans un premier temps à des rappels généraux sur les STEC (physiologie, facteurs de virulence, épidémiologie). Puis, l'impact de la présence des STEC dans les fromages sera évoqué : prévalence des STEC dans les produits laitiers, implication de ceux-ci dans des épidémies liées à la consommation de fromages et les moyens de prévention. La technologie fromagère (définition du fromage et facteurs pouvant affecter les STEC au cours de la fabrication d'un fromage) sera enfin abordée.

L'étude expérimentale quant à elle répondra aux questions ayant motivé ce projet. L'ensemble des travaux destinés à étudier le comportement des STEC au cours de la fabrication de fromage au lait cru et de la digestion artificielle de ceux-ci sera décrit selon les modalités suivantes :

- Etude du comportement de souches STEC de sérotypes O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O157:H7 au cours de la fabrication, de l'affinage et de la conservation de 5 technologies fromagères au lait cru différentes.
- Etude du comportement de souches STEC de sérotype O26:H11 et O157:H7 ayant survécu au processus de fabrication fromager au cours d'une digestion artificielle.

Les résultats expérimentaux seront exposés sous la forme de 2 publications.

Mémoire

Bibliographique

CHAPITRE 1. Généralités relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

Tout au long de ce chapitre, les données générales concernant les STEC seront abordées. Leurs principales caractéristiques biologiques, leurs facteurs de virulence, mais aussi les symptômes associés à ces pathogènes ainsi que leurs implications dans certaines grandes épidémies seront décrits.

1. Données taxonomiques

1.1. L'espèce *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* appartient, ainsi que *Salmonella* ou encore *Shigella*, à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les *Escherichia coli* sont des bacilles à coloration de Gram négative, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates. Ces bactéries sont catalase-positives et ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990). Elles font parties de la flore commensale de l'Homme et des animaux à sang chaud (Euzéby, 2011).

Le bacille *Bacterium coli commune* a été décrit pour la première fois en 1885 après avoir été isolé dans des selles de nourrissons par l'allemand Theodor Escherich. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* (Grimont, 1987).

Initialement, le genre *Escherichia* regroupait six espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. albertii* et *E. vulneris*, mais récemment, Priest & Barker (2010) ont démontré que

les souches d'*E. blattae* devaient être reclassées dans le genre *Shimwellia* en tant qu'espèce *Shimwellia blattae*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques particulières, permettant de les différencier (Grimont, 1987) (Tableau 1).

Escherichia coli a la particularité de coloniser le tractus gastro-intestinal dans les premières heures de la vie et il représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988 ; Nataro & Kaper, 1998 ; Vernozy-Rozand & Montet, 2001).

Tableau 1. Principaux caractères permettant la différenciation des espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. albertii*).

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

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

ODC, Ornithine Décarboxylase.

1.2. Classification des *Escherichia coli* en sérogroupes et en sérotypes

Une classification fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman en 1944 permet de différencier les *Escherichia coli*. Cette classification se base sur la détermination des

antigènes de surface (Nataro & Kaper, 1998). Deux antigènes sont principalement pris en compte : les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Les antigènes K capsulaires sont moins fréquemment utilisés car non-communs à tous les *E. coli*. Nous avons fait le choix de ne pas les décrire ici. Les antigènes somatiques O définissent le sérotype des *E. coli*. Il existe près de 180 antigènes O différents et 56 antigènes H différents. Une combinaison spécifique d'un antigène O et d'un antigène H définit le sérotype. La recherche des antigènes se fait à l'aide d'antisérum lors de tests d'agglutination, mais certains travaux font appel au sérotypage moléculaire, à l'aide d'outils de type PCR, qui consiste à caractériser les gènes impliqués dans la formation des antigènes (Ramos Moreno *et al.*, 2006). Certains sérotypes d'*E. coli* sont régulièrement associés à des pathologies, mais la virulence de ces souches n'est pas dépendante de ces antigènes (Gyles, 2007). En effet, ces antigènes sont un critère d'identité, pas de pathogénicité.

Cette classification permet d'obtenir, en considérant les trois antigènes O, H et K, plus de 800 000 sérotypes différents. A l'heure actuelle, seulement 2000 sérotypes environ ont été réellement isolés.

1.3. Les antigènes somatiques

Les antigènes O somatiques sont de nature lipopolysaccharidique et sont situés sur la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Le lipopolysaccharide (LPS) est formé de 3 parties: le lipide A (relativement conservé chez *E. coli* et intégré dans la membrane externe), la région centrale et enfin une chaîne polysaccharidique variable, l'antigène O, qui est composée d'unités répétées comprenant de 2 à 7 sucres (Stenutz *et al.*, 2006).

Les différences antigéniques des chaînes spécifiques sont liées soit à la nature des sucres qui composent le chaînon répété soit à leur mode de liaison. La détermination de l'antigène O par des sérums montre l'existence de réactions croisées avec les LPS d'autres bactéries Gram-négatif (Stenutz *et al.*, 2006). La majorité des enzymes intervenant dans les différentes étapes de la biosynthèse de l'antigène O sont codées par des gènes regroupés en général sur le chromosome au niveau du locus *rfb*. La recherche de ces gènes par PCR est généralement utilisée pour déterminer le sérotype de ces bactéries. Les techniques de biologie

moléculaire permettent aussi de sérogrupper les mutants incapables de synthétiser l'antigène O dénommés OR, pour « O rough » (Osborn *et al.*, 1964).

1.4. Les antigènes flagellaires

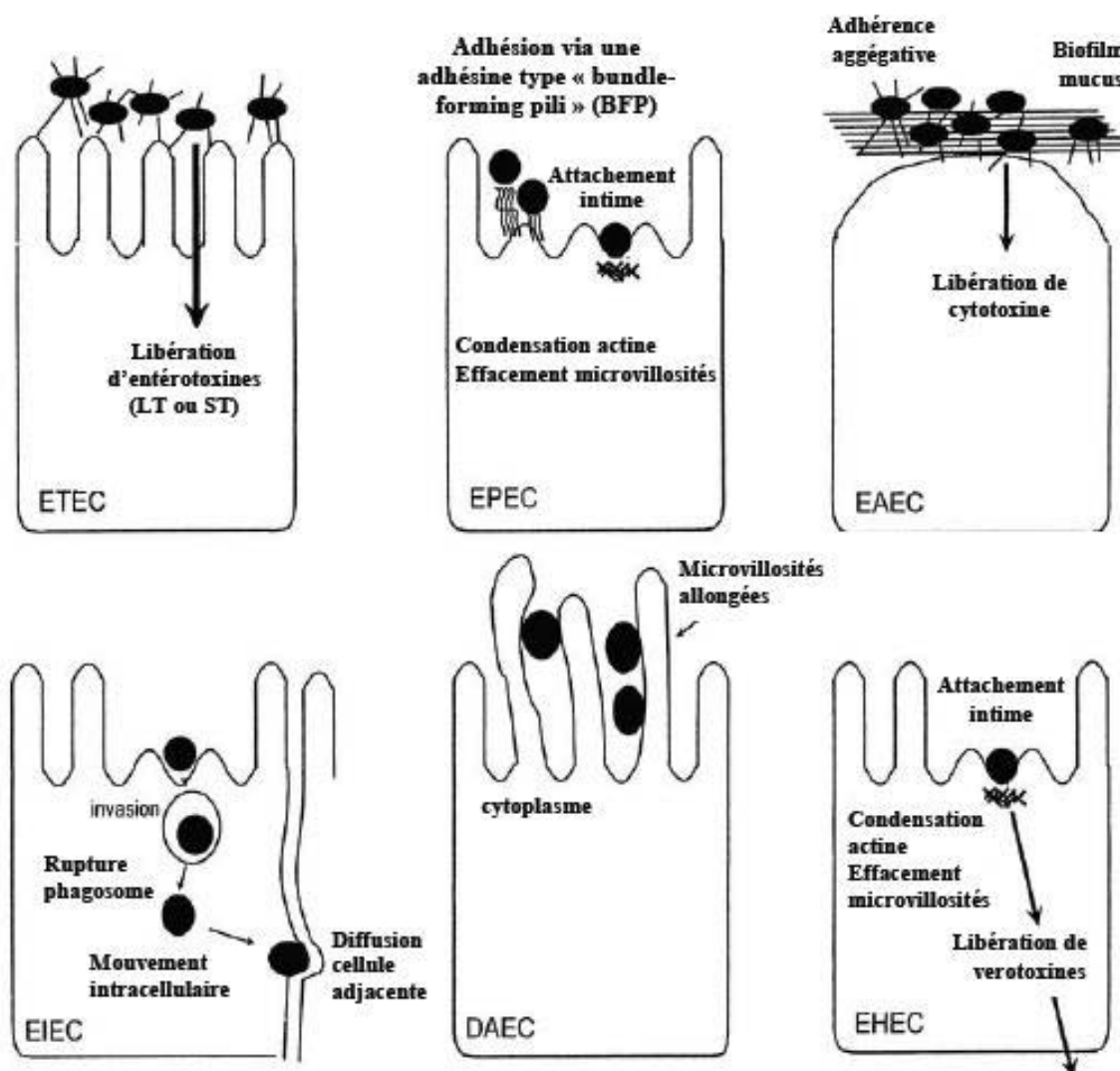
Chez *E. coli*, les flagelles sont constitués de trois parties : un corpuscule basal, un crochet et un filament hélicoïdal formé d'un assemblage de flagelline. Plus de 40 gènes répartis principalement dans 4 clusters sont impliqués dans la formation et le fonctionnement du flagelle. La flagelline, immunogène et constituant l'antigène H est généralement codée par le gène *fliC*. Chez *E. coli*, les parties N-terminale et C-terminale de la flagelline sont conservées, tandis que la partie centrale, exposée à l'environnement, est hautement variable (Wang *et al.*, 2003). Cette diversité proviendrait des transferts horizontaux et des recombinaisons d'ADN étranger qui généreraient de nouveaux allèles de *fliC* et ainsi de la diversité antigénique (Reid *et al.*, 1999). Les souches d'*E. coli* dans l'incapacité de synthétiser un flagelle fonctionnel sont classées comme non-mobiles (NM ou H-).

1.5. Classification médicales en pathotypes des *E. coli* responsables de troubles intestinaux

La majorité des souches de *E. coli* sont commensales et inoffensives sauf si l'hôte est immunodéprimé ou si la barrière gastro-intestinale est compromise (Kaper *et al.*, 2004). Néanmoins, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales : infections urinaires (UPEC), méningites (MNEC) ou septicémies (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000). En ce qui concerne les pathologies intestinales, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont les suivants: colonisation des muqueuses, éventuellement invasion des cellules, multiplication, dommages à l'hôte.

Il n'existe pas de classification standardisée des différents pathotypes d'*E. coli*. Une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 7 groupes est utilisée par les médecins (dont 6 sont présentés dans la Figure 1) :

Figure 1. Pathogénie associée aux six pathovars d'*E. coli* responsables de diarrhée (Nataro & Kaper, 1998).



Les *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC)

Ils sont majoritairement associés à deux syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur. Ils sont présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle et leur pouvoir pathogène s'explique par la sécrétion de toxines thermostables et/ou thermolabiles (Levine, 1987).

Les *E. coli* Adhérents et Invasifs (AIEC)

Ce groupe a été décrit plus récemment. Ces *Escherichia coli* ont la capacité particulière d'adhérer puis d'envahir les cellules de la muqueuse intestinale. Ces pathogènes possèdent un ensemble de gènes (appelé opéron *lpf*) qui permet l'expression de filaments utiles à l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes, les « Long Polar Fimbriae (LPF) ». Ces LPF permettraient aux AIEC d'interagir avec les cellules M liées aux plaques de Peyer. Les AIEC seraient notamment impliquées dans la maladie de Crohn (Chassaing *et al.* 2011).

Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)

Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Ils sont biochimiquement et génétiquement assez proches de *Shigella* spp. (Brenner *et al.*, 1972), tout comme leur mode de pathogénicité : endocytose au niveau des entérocytes du côlon, lyse de la vésicule d'endocytose et multiplication provoquant la mort cellulaire. Ces bactéries sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme des cellules et de pénétrer ensuite dans la cellule adjacente par la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle.

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Ils ont été associés à des diarrhées chez les jeunes enfants, en particulier entre 1 et 5 ans. Les diarrhées peuvent être aqueuses et contenir du mucus. Ce pathotype est également associé à des infections urinaires. Il existe 2 types de DAEC, ceux qui codent pour une adhésine fimbriaire (appartenant à la famille Afa/Dr), impliqués dans les infections urinaires et les troubles digestifs et ceux qui codent pour une adhésine impliquée dans le phénomène d'adhérence « diffuse » (AIDA-I). Ce deuxième type de DAEC est responsable de diarrhées chez les enfants et provoque au niveau de l'intestin des lésions similaires aux lésions de type A/E observables dans le cas d'infections liées aux EPEC et à certains EHEC (Servin, 2005).

Les *E. coli* Enteropathogènes (EPEC)

Ils sont responsables de diarrhées infantiles et touchent en particulier les enfants en bas âge (< 3 ans). Des lésions histopathologiques apparaissent lors des infections. Ces lésions sont appelées lésions d'attachement et d'effacement (Andrade *et al.*, 1989) et sont caractérisées

par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence des bactéries à la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène chromosomique *eae* (« *attaching and effacing E. coli* ») et le gène *bfp* (bundle-forming pili) sur le plasmide pEAF (« *EPEC adherence factor* ») sont impliqués dans cette virulence (Bugarel *et al.*, 2011 ; Jerse *et al.*, 1991). Néanmoins, des études récentes ont démontré que certains EPEC dit « atypiques » (aEPEC) ne possèdent pas le plasmide pEAF mais restent néanmoins pathogènes (Scaletsky *et al.*, 2010) (Figure 2).

Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)

Ils ont été récemment reconnus comme responsables de diarrhées persistantes. Les EAEC colonisent l'épithélium de l'intestin grêle et du gros intestin en produisant une adhésion dite « auto-aggrégative » en « briques empilées » à l'aide d'adhésines fimbriaires appelées « *aggregative adherence fimbriae* » (AAFs) et formant des biofilms épais provoquant des dommages à la muqueuse intestinale. Les EAEC sécrètent plusieurs toxines dont la *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) et la toxine EAST1 (« *EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1* ») homologue à l'entérotoxine thermostable des ETEC (Kaper *et al.*, 2004). Certaines souches EAEC ont aussi pu acquérir le gène *stx* codant pour la Shiga-toxine. Ces souches sont alors capables de provoquer certaines pathologies graves telles que le syndrome hémolytique et urémique et même la mort. Ces souches sont appelées EAHEC (enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli*) (Beutin & Martin, 2012), mais certains auteurs les classent comme des EHEC atypiques.

Les *E. coli* Enterohéorragiques (EHEC)

Ils sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley *et al.*, 1983). Les EHEC possèdent au moins un gène *stx* (*stx1* codant pour la Shiga-toxine 1 ou *stx2* codant pour la Shiga-toxine 2) (Karmali *et al.*, 2010 ; Nataro & Kaper, 1998) ainsi que, potentiellement, d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* (Levine & Edelman, 1984) ou encore les gènes *nle* et *ehx* (Bugarel *et al.*, 2010a).

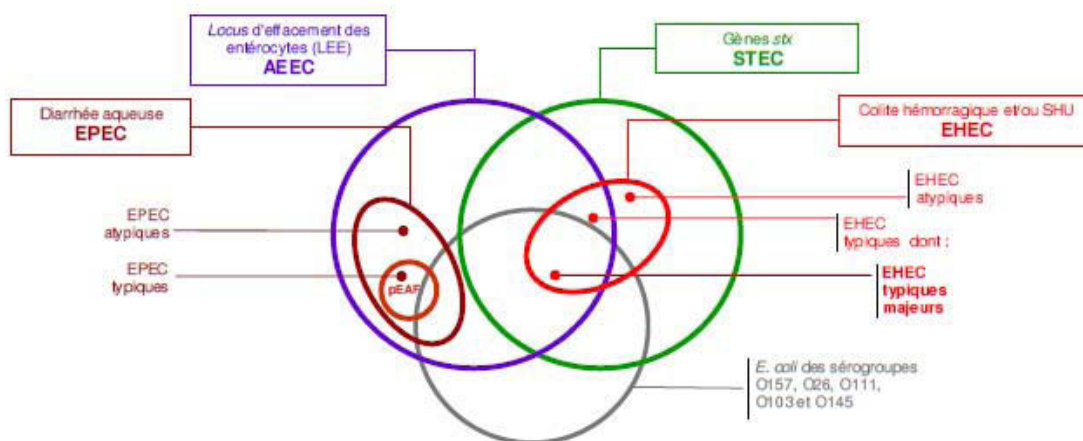
2. Les STEC pathogènes

L'objectif de cette partie est de décrire les STEC pathogènes (dont une certaine partie d'entre eux est appelée EHEC) ainsi que leurs principaux facteurs de virulence.

2.1. Définition de l'ANSES

Dans son avis de 2010 (AFSSA – saisine n°2010-SA-0031), l'ANSES (anciennement AFSSA) a défini la notion de « STEC pathogène » en prenant en compte le patrimoine génétique des souches (Figure 2).

Figure 2. Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli* (AFSSA 2010 - Naylor *et al.*, 2005). Les surfaces des disques et intersections ne sont pas proportionnelles à la prévalence des différents types d'*E. coli*.



D'après ce diagramme, toutes les souches possédant le locus d'effacement des entérocytes (LEE) sont des AEEC. Seules les souches ayant provoqué des pathologies chez l'être humain sont nommées EPEC. Parmi celles-ci nous pouvons distinguer les EPEC typiques et atypiques en fonction de la présence, ou non, du plasmide *pEAF*.

Les STEC quant à eux possèdent un ou plusieurs gènes *stx* codant pour la Shiga-toxine. Ce gène est porté par un prophage de type lambdaïde (ceci sera décrit plus loin). Les STEC peuvent posséder ou non le LEE.

Il est cependant très important de souligner que tous les STEC ne sont pas pathogènes. Les STEC responsables de pathologies chez l'être humain sont eux qualifiés de EHEC typique s'ils possèdent le LEE ou atypique s'ils en sont dépourvus. Les souches de EHEC sont donc toutes isolées de patients.

Plus de 200 sérotypes de EHEC ont déjà été associés à l'apparition de symptômes cliniques sévères (diarrhée hémorragique, SHU) (Karmali *et al.*, 2003), mais seuls certains d'entre eux sont fréquemment impliqués dans des épidémies. En ce qui concerne les EHEC typiques, l'AFSSA en 2008 (AFSSA –Saisine N°2008-SA-0122) a défini comme EHEC « majeurs » les souches *E. coli* de sérotype O157:H7 (le plus fréquemment impliqué dans les épidémies), O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O111:H8, ainsi que leurs dérivés non-mobiles. Ces sérotypes appartiennent aux séropathotypes A et B. Ces séropathotypes sont les plus fréquemment impliqués dans des épidémies et ils sont associés aux pathologies les plus graves (Tableau 2). En ce qui concerne les EHEC atypiques, les 2 principales épidémies ont été causées par une souche EAHEC appartenant au sérotype O104:H4 en Allemagne et en France en 2011 après consommation de graines germées de fenugrec contaminées.

Tableau 2. Classification des sérotypes de STEC en séropathotype (Karmali *et al.*, 2003).

Séropathotype	Incidence relative	Fréquence d'implication dans les épidémies	Association à des symptômes graves (SHU, colite hémorragique)	Sérotypes
A	Elevée	Commune	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	Peu commune	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21, autres
D	Faible	Rare	Non	Multiple
E	Non-humain	Non-applicable	Non-applicable	Multiple

2.2. Pathogénicité

La taille du génome des souches pathogènes d'*E. coli* est supérieure de plusieurs centaines de kilobases à celle de souches non-pathogènes : par exemple, dans le cas de souches pathogènes d'*E. coli* O157:H7, 4,1Mb de leur génome est similaire à celui de *E. coli* K12, mais ces souches pathogènes contiennent environ 1,4Mb en plus codant pour de nombreux facteurs de virulence (gènes *stx* porté par des prophages, LEE...) (Ogura *et al.*, 2007a). La plupart des études menées à ce jour ont porté sur le sérotype O157:H7, mais il a été démontré que seul 20% des gènes spécifiques à ce sérotype sont conservés chez les souches EHEC non-O157.

2.3. Les facteurs de virulence des STEC

2.3.a. Les Shiga-toxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines capables d'inhiber *in vitro* les cellules Vero (cellules rénales du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication (Konowalchuk *et al.*, 1977). Ces toxines, initialement nommées Vérotoxines, sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (SlT) étant donné leurs homologues avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982). Il existe deux grandes classes de Shiga-toxines : les toxines Stx1 et les toxines Stx2. Ces toxines ont en commun le même récepteur, elles sont toutes deux formées des sous unités A et B et elles possèdent les mêmes mécanismes d'action intra-cellulaire. Cependant, elles sont immunologiquement distinctes et ne sont identiques qu'à 56% au niveau de leur séquence d'acides-amino (Paton & Paton, 1998). Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques dus à des mutations de la séquence codante des toxines Stx1 et Stx2 a été décrit (Beutin *et al.*, 2007a). Néanmoins, les variants de Stx2 sont homologues de 84 et 99% à Stx2. Il a été démontré que les Shiga-toxines et leurs variants (Mainil & Daube, 2005) n'ont pas toutes la même cytotoxicité : à titre d'exemple, les études réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux ont montré que la Shiga-toxine de type 2 est une toxine environ mille fois plus puissante que la Shiga-toxine de type 1 (Law, 2000). Les Shiga-toxines sont codées par un opéron d'environ 1230 pb

généralement porté par un bactériophage de type lambdaïde. Les gènes *stx* sont situés en aval du promoteur tardif du prophage et sont hautement exprimés lorsque le cycle lytique du prophage est activé.

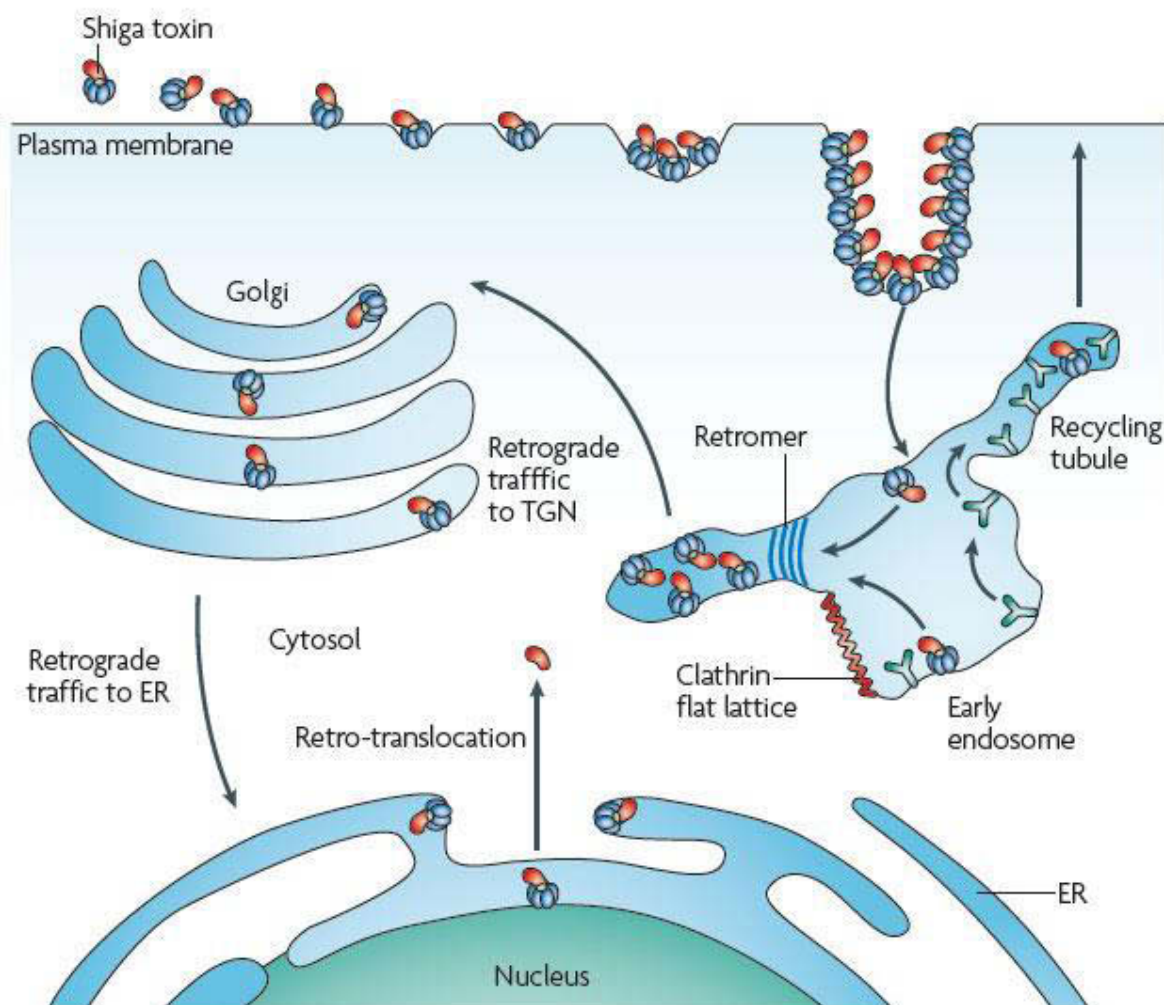
Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. Les sous unités de la toxine sont assemblées dans le périplasme. Une fois assemblée, la toxine est relarguée lors de la lyse de la bactérie par le phage (Johannes & Römer, 2010).

Le mécanisme d'action de la toxine est le suivant :

- lors d'une première étape, la toxine se fixe à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique de type glycosphingolipide (GSL), le globotriosyl céramide Gb3 (Betz *et al.*, 2012 ; Lingwood *et al.*, 1987). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose (Figure 3) (Johannes & Römer, 2010) puis elle est redirigée vers une vésicule formée de manière dépendante de la clathrine. Ces vésicules sont ensuite adressées au réseau trans-Golgien via l'action du complexe rétromère. La toxine subit alors un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique.

La sous-unité A de la toxine est clivée en deux parties, le fragment A1 possédant l'activité catalytique de la toxine et le fragment A2 toujours lié à la sous-unité B de la toxine, au niveau de l'endosome. Néanmoins, les fragments A1 et A2 restent liés par des ponts disulfures. La séparation de ces 2 fragments a lieu au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique par la réduction du pont disulfure. Le fragment A1 est alors libéré dans le cytoplasme de la cellule.

Figure 3. Traffic intra-cellulaire de la Shiga toxine (Johannes & Römer, 2010).



TGN : trans Golgi network (réseau trans-Golgien), ER : Réticulum Endoplasmique

Cette toxine, qui cible principalement les cellules endothéliales des artérioles renales et cérébrales, agit alors à différents niveaux (Johannes & Römer, 2010).

- L'effet le plus connu est l'arrêt de la synthèse protéique. La sous-unité A1 activée de la toxine possède une activité N-glycosidase capable de cliver une base adénine sur l'ARN ribosomique 28S, bloquant ainsi la sous-unité 60S du ribosome, conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et à une cascade de réactions appelée « réponse au stress ribotoxique » aboutissant à la mort de la cellule.
- L'activation de voies de signalisation : la fixation de la sous unité B de la toxine aux récepteurs Gb-3 entraîne le recrutement et l'activation de nombreuses tyrosines kinases

phosphorylant diverses protéines dont notamment la clathrine ce qui a pour effet d'accroître l'assimilation de la toxine. Une fois dans la cellule, la toxine active aussi d'autres kinases. L'adhésion de la toxine sur la membrane plasmique induit aussi un remodelage du cytosquelette et une redistribution de certaines protéines (Johannes & Römer, 2010).

- La synthèse et le relargage de cytokines : certaines cellules, malgré l'expression de récepteurs Gb3, sont résistantes à cette toxine comme, par exemple, les monocytes. Néanmoins, en réponse à la fixation de ces toxines et leur internalisation, ces cellules expriment certaines cytokines. L'expression de cytokines pro-inflammatoires a pour conséquence de stimuler l'expression des facteurs Gb3 pour de nombreuses cellules endothéliales, rendant encore plus vulnérables les cellules sensibles à cette toxine dont notamment les cellules de l'endothélium des reins et du système nerveux central. Ironiquement, c'est en tentant de protéger l'organisme de la toxine que le système immunitaire rend plus vulnérable certains organes (Johannes & Römer, 2010).

- L'apoptose : la Shiga-toxine peut induire l'apoptose. La toxine peut induire un stress au niveau du réticulum endoplasmique provoqué par une accumulation de protéines mal conformées au sein de celui-ci conduisant à une cascade d'évènements dont l'activation de différentes caspases qui induisent finalement l'apoptose.

Le récepteur Gb3 ne serait apparemment pas le seul récepteur impliqué dans le mécanisme d'action des Shiga-toxines. En effet, une étude utilisant un système de culture d'organes *in vitro* a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 (Schüller *et al.*, 2004). Or, le récepteur Gb4 peut lui aussi être, à plus faible échelle, impliqué dans le mécanisme d'action de ces toxines (Bauwens *et al.*, 2012 ; Johannes & Römer, 2010). De plus, le variant Stx2e peut lui se lier au récepteur Forssman GSL et à l'inverse des autres variants, possède plus d'affinité pour le récepteur Gb4 que pour le récepteur Gb3 (Bauwens *et al.*, 2012).

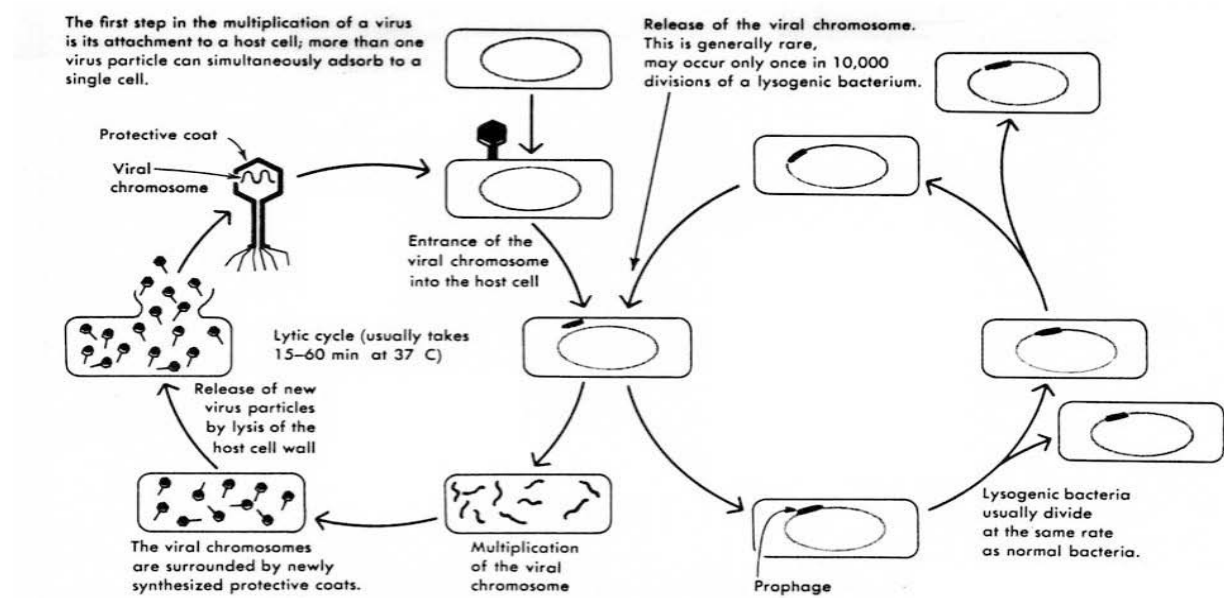
2.3.b. Le phage lambdaïde, clef de la pathogénicité ?

Les gènes *stx* sont portés par des phages de type lambdaïde comme précisé plus haut. Ces phages ont la particularité de pouvoir induire un cycle lysogénique, c'est-à-dire d'insérer leur génome au sein du chromosome bactérien et de pouvoir « mettre en sommeil » leur

matériel génétique. Ce blocage de l'expression des gènes phagiques est rendu possible par l'expression d'un répresseur de transcription, *ci*, se fixant sur les régions promotrices très précoces et précoces des gènes du prophage. Ce phénomène empêche ainsi l'activation du cycle lytique du prophage (réplication induisant la lyse de l'hôte) (Figure 4).

Si, *in vivo*, les mécanismes d'activation du prophage et donc l'expression des gènes *stx* restent encore à être élucidés, ceux-ci sont largement décrits *in vitro*. En effet, plusieurs études ont mis en exergue que des dommages à l'ADN pouvaient induire l'activation du phage : des agents induisant une destruction de l'ADN (UV, certains antibiotiques comme la mitomycine C...) entraînent l'activation de la réponse SOS régulée par la protéine RecA. En présence d'ADN simple brin, la protéine RecA se fixe sur l'ADN endommagé pour former des filaments et acquiert ainsi une activité protéase. RecA ainsi activée induit l'autoclivage du répresseur LexA qui réprime les gènes du régulon SOS (Janion, 2001). Or, cette protéine RecA a aussi pour effet de provoquer l'autoclivage du répresseur de transcription « *ci* » et donc, de permettre à l'ARN polymérase de transcrire les gènes phagiques.

Figure 4. Schéma représentant les différences entre cycle lytique et cycle lysogénique des phages de type lambda (Online Textbook of Bacteriology, Kenneth Todar, www.textbookofbacteriology.net).



D'autres agents n'induisant pas l'expression de RecA (agents chélateurs tels que l'EDTA) (Imamovic & Muniesa, 2012) peuvent aussi induire *in vitro* l'expression des gènes phagiques

et donc des gènes *stx*. Il semble que divers stress soient capables d'induire le cycle lytique du prophage. Ce dernier peut aussi activer spontanément son cycle lytique. Yue *et al.* (2012) ont démontré que les températures proches de 30 °C ainsi que les UV pouvaient augmenter l'induction des phages Stx2. De plus, un effet synergique important entre température et UV avait été observé lorsque les températures appliquées étaient supérieures à 28°C. Ces mêmes auteurs ont ensuite incubé des *E. coli* non-pathogènes en présence de la solution de phage Stx2 obtenue ; ils ont alors observé que plusieurs de ces *E. coli* avaient été infectées par le phage Stx2 et pouvaient alors produire la Shiga-toxine. Il a ainsi été démontré que des phages Stx peuvent infecter et induire une lysogénie chez des souches d'*E. coli* non pathogènes, les transformant ainsi en STEC capables de produire la Shiga-toxine après induction par UV (Yue *et al.*, 2012). Il a de plus été observé que les souches de sérotype O26:H11 sont susceptibles de perdre le phage portant le gène *stx* au cours de l'infection (Bielaszewska *et al.*, 2007). Il est également possible que les gènes *stx* puissent être perdus au cours d'étapes de culture (Karch *et al.*, 1992). Enfin, l'acquisition des gènes *stx* par des souches d'*E. coli* O26 *stx*- a été démontrée *in vitro* (Bielaszewska *et al.*, 2007).

En ce qui concerne la transduction du phage Stx au sein de denrées alimentaires et notamment dans le fromage, une étude récente (Picozzi *et al.*, 2012) a démontré un impact direct du phénomène de transduction des phages en fonction de la température : à 4°C aucun phénomène de transduction n'a pu être observé, tandis qu'un important phénomène de transduction a été mis en évidence à 37°C. Néanmoins, le taux de cellules possédant le phage nécessaire pour observer une transduction est bien plus important que le taux de STEC naturellement présent dans le lait. Mais les auteurs insistent sur le fait que ce phénomène peut toujours se produire.

Les phages jouent ainsi un rôle primordial dans l'émergence de nouvelles souches EHEC.

2.3.c. Les facteurs d'adhésion

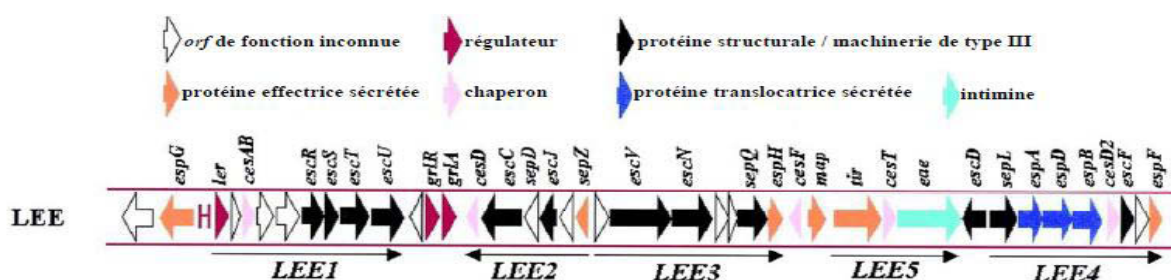
Après avoir passé l'estomac, les bactéries atteignent l'intestin où elles colonisent la muqueuse en adhérant aux cellules épithéliales. Le côlon est le principal site de colonisation des STEC chez l'Homme (Karmali *et al.*, 2010).

La colonisation du tube digestif est une étape majeure de la physiopathologie des STEC et fait intervenir plusieurs facteurs d'adhésion. Ces facteurs 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 (Wagner & Hensel, 2011). Chez les STEC, il existe de nombreux facteurs responsables du processus d'adhésion.

La colonisation du tube digestif par certaines souches de STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites lésions d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum (Donnenberg *et al.*, 1993). Ces lésions d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal (Ismaili *et al.*, 1995) et un réarrangement pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales serait à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections.

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Le LEE est notamment caractérisé par un système de sécrétion de type III (Jarvis & Kaper, 1996). Il est composé de l'intimine qui est une protéine de la membrane externe qui permet l'attachement de la bactérie à l'entérocyte et qui est impliquée dans l'effacement des microvillosités. Cette protéine est codé par le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) (Jerse *et al.*, 1991). A ce jour, un peu moins d'une vingtaine de variants du gène de l'intimine ont été retrouvés chez les *E. coli* possédant le LEE. Le gène *tir* quant à lui code pour le corécepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor) qui s'insère dans la membrane plasmique de l'entérocyte (Figure 5).

Figure 5. Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes. Les couleurs des flèches indiquent la fonction des gènes correspondants (Garmendia *et al.*, 2005).



D'autres effecteurs sont codés par les gènes présents au niveau du LEE comme l'effecteur Map (« *mitochondrion-associated protein* »), essentiel dans les phénomènes d'altération de la barrière intestinale et des jonctions serrées entre les entérocytes ou encore EspF qui intervient dans le phénomène d'effacement des microvillosités, d'altération de la barrière intestinale et l'apoptose. EspB quant à lui joue un rôle dans la translocation des effecteurs, l'effacement des microvillosités et la modification du cytosquelette. EspH est impliqué dans la formation du piédestal et de son élongation (Wong *et al.*, 2012). EspZ est impliqué dans la régulation du phénomène de translocation des systèmes de sécrétion de type 3 (Berger *et al.*, 2012). Le système de sécrétion de type 3 (SSTIII) est un assemblage protéique complexe permettant aux bactéries d'injecter certaines de leurs protéines directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Tobe *et al.*, 2006). D'autres facteurs d'adhésion existent mais ne seront pas développés ici.

Des facteurs d'adhésion non-codés par le LEE interviennent aussi dans le phénomène d'adhésion comme TccP (« *Tir cytoskeleton coupling protein* »). TccP est un effecteur de type III porté par un prophage extérieur au LEE et a été caractérisé à partir de souches EHEC O157:H7 (Garmendia *et al.*, 2004). Plus récemment, TccP2, un variant de TccP a été identifié chez des souches EHEC O157:H7 et non-O157 (Ogura *et al.*, 2007b). Ces facteurs sont impliqués dans la cascade de réactions initiée par la translocation de Tir dans l'entérocyte et aboutissant à la polymérisation des fibres d'actine.

2.3.d. Formation des lésions d'attachement/Effacement

Les premières étapes d'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte sont encore peu décrites. Les gènes du LEE sont ensuite activés par des mécanismes complexes répondant à divers signaux (température, concentration en glucose, fer, quorum sensing). Ces mécanismes font intervenir des régulateurs tels que « Ler » (« *LEE encoded regulator* ») ou encore « GrlA » (« *global regulator of LEE activator* ») (Gyles, 2007 ; Spears *et al.*, 2006).

Le SSTIII permet la sécrétion des protéines effectrices comme EspA dont l'assemblage forme une structure en tube par laquelle transitent les facteurs EspB, EspD, responsables de la formation d'un pore dans la membrane de la cellule hôte (Yoon & Hovde, 2008). Cet ensemble constitue une « seringue moléculaire » qui part du cytoplasme bactérien et

traverse les membranes internes et externes de la bactérie avant de s'insérer dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (Gyles, 2007). Les effecteurs de type III sont alors transloqués dans la cellule eucaryote par l'intermédiaire de cette structure. Le récepteur de l'intimine, Tir, s'insère spontanément dans la membrane de l'entérocyte en formant une structure en boucle. Les parties N- et C- terminales se retrouvent dans le cytoplasme de l'entérocyte et la partie centrale, exposée à la surface de la cellule, interagit avec l'intimine (Garmendia *et al.*, 2005). La polymérisation de l'actine serait quant à elle provoquée par TccP/TccP2 (Crepin *et al.*, 2010).

2.3.e. Autres facteurs d'adhésion

Les souches LEE-négatives sont en général non-pathogènes, mais certaines d'entre elles ont cependant été associées à des SHU (EHEC atypiques). Ces souches atypiques possèdent donc d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique aussi efficace que l'intimine.

De nombreuses adhésines potentielles ont été décrites chez des souches EHEC atypiques telles que l'adhésine Saa (pour « STEC autoagglutinating adhesin ») des souches *E. coli* O113:H21 isolées en Australie en 1998 (Paton *et al.*, 2001) ou encore les facteurs d'adhésion plasmidiques habituellement rencontrés chez les EAEC (formation d'adhésions agrégatives et non d'adhésions localisées) des souches LEE-négatives O111:H2 isolées en France en 1995 suite à une épidémie (Morabito *et al.*, 1998). Ces mêmes facteurs ont été retrouvés chez la souche épidémique *E. coli* O104:H4 allemande en 2011 permettant l'adhésion agrégative de ces bactéries grâce à des *fimbriae* AAF (aggregative adherence *fimbriae*) dont l'expression est régulée par le gène *aggR* présent sur le plasmide de virulence pAA des EAEC (Beutin & Martin, 2012).

Ainsi, de nombreuses protéines susceptibles de jouer un rôle dans la colonisation du tube digestif par les EHEC ont été décrites. Cependant, leur implication dans la pathogénicité des souches reste encore à être démontrée.

2.3.f. Autres facteurs impliqués dans la virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité) ont été décrits chez les souches EHEC (Croxen & Finlay, 2010).

Ils regroupent :

- des toxines, telles que l'entérohémolysine E-hlyA, mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin *et al.*, 1988), l'entérohémolysine thermostable EAST1, la cytotoxine subtilase (SubAB), les cyclomodulines CDT (pour « Cytolethal Distending Factor ») ou encore Cif (pour « Cycle inhibiting factor ») ;
- des protéases, telles que la sérine protéase EspP, la catalase peroxydase KatP, la métalloprotéase StcE ;
- des systèmes de captation du fer, notamment le sidérophore codé par l'îlot de pathogénicité HPI (pour « High Pathogenicity Island ») ;
- des systèmes de résistance à l'acidité gastrique (explicités plus loin) ;
- des uréases ;
- des protéines de fonction encore mal connue comme les effecteurs Nle (pour « Non LEE encoded effector »).

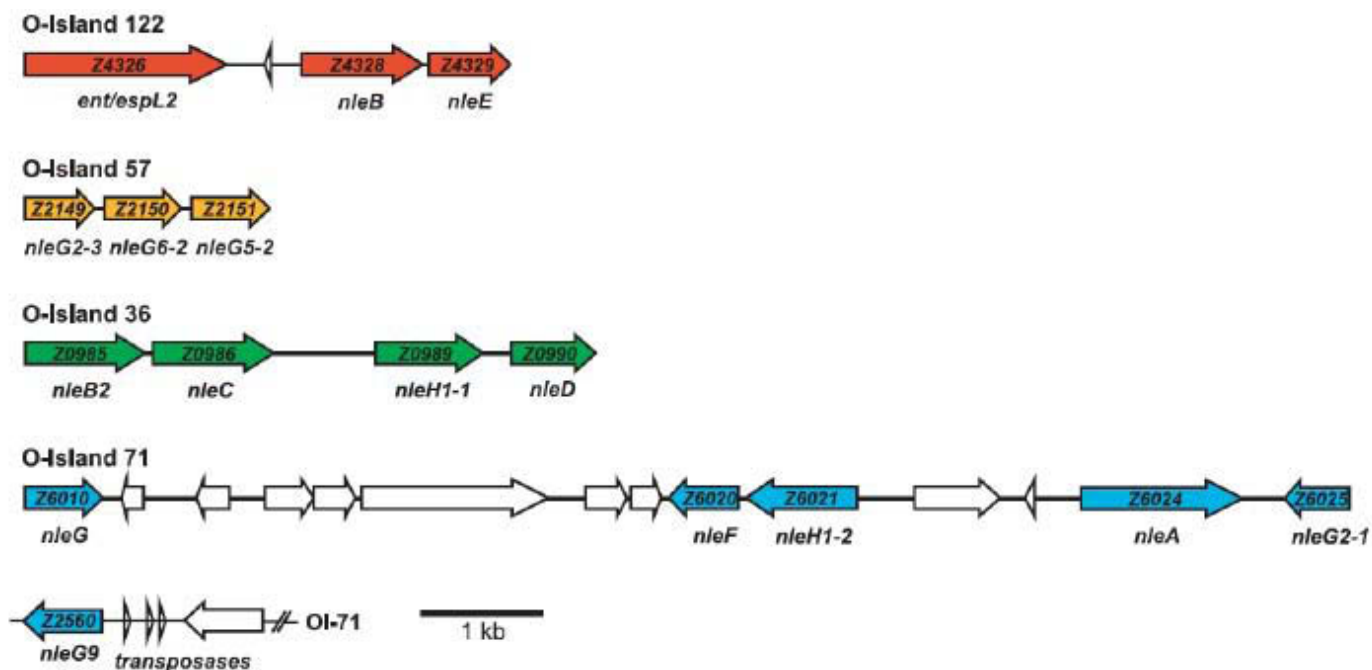
La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais à ce jour, leur rôle respectif dans la pathogénicité des EHEC n'a pas été démontré.

Les « O Islands » (OI), sont des cas particuliers car ils correspondent à des îlots ou segments génétiques présents dans le génome des EHEC (dont *E. coli* O157:H7) mais absents du génome des *E. coli* non-pathogènes. Au total, 177 îlots ont été identifiés (Perna *et al.*, 2001). Certains contiennent des facteurs de virulence potentiels, d'où leur qualification d'îlots de pathogénicité.

Certains îlots regroupent des gènes codant pour des effecteurs de type III appelés Nle (Tobe *et al.*, 2006). La distribution des gènes *nle* au sein des îlots est variable d'une souche à l'autre, et l'on remarque que plus les îlots contiennent de gènes *nle* (c'est à dire plus ils sont complets), plus le risque de pathologie est important. Cette observation est valable pour trois îlots de pathogénicité: OI-57, OI-71 et OI- 122 (Coombes *et al.*, 2008). Au total, 16 gènes *nle* (*nleA*, *nleB*, *nleB2*, *nleC*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, *nleG9*,

nleH1-2, *nleH1-1*, *nleF* et *ent/espL2*), répartis sur 4 îlots de pathogénicité différents (figure 6), ont été identifiés comme étant plus fréquemment présents dans des souches EHEC que dans des souches STEC n'ayant jamais provoqué d'épidémie ou de SHU (Coombes *et al.*, 2008 ; Karmali *et al.*, 2003). Le gène *nleB* serait même commun aux souches EHEC et EPEC les plus pathogènes et serait un très bon indicateur de pathogénicité (Bugarel *et al.*, 2011).

Figure 6. Répartitions des gènes *nle* sur les différents îlots de pathogénités (Coombes *et al.*, 2008).



2.3.g. L'acido-résistance

Une étape cruciale dans le processus de pathogénicité de ces bactéries correspond au passage dans l'estomac. Lors du passage dans ce compartiment, le pH extérieur chute en dessous de 2,5.

Dans ce type d'environnement, les protons peuvent alors pénétrer dans la cellule et ainsi baisser le pH du cytoplasme. Ce phénomène induit des mal-conformations des protéines et des agrégations de celles-ci conduisant à la mort de la cellule. Les STEC peuvent grâce à différents mécanismes maintenir un pH cytoplasmique à 4,5, tolérable pour la cellule alors que celui-ci est à 2,5 (ou moins) à l'extérieur dans l'estomac (Foster, 2004).

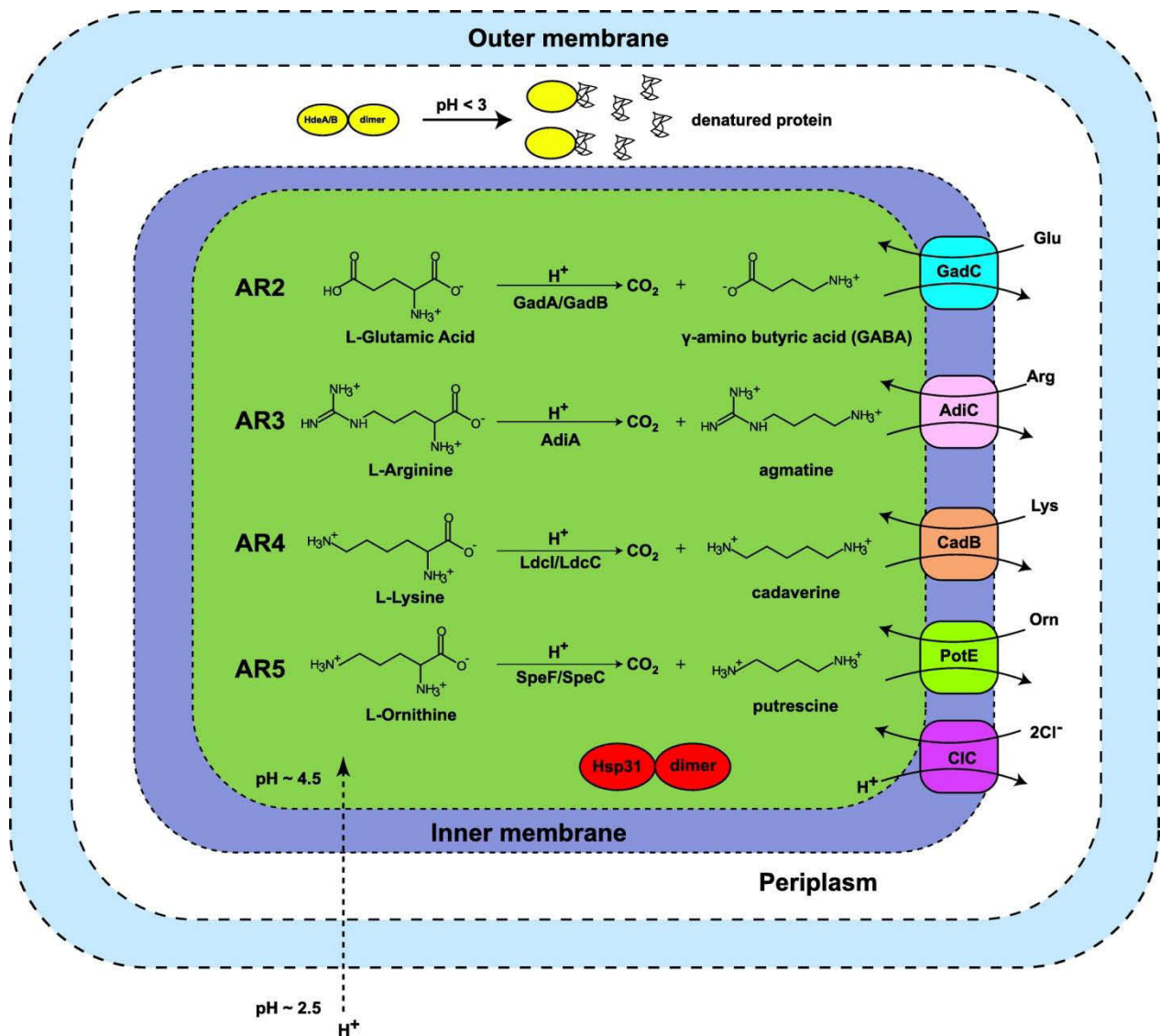
Cinq systèmes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence (AR1 à AR5) chez les *E. coli*. Le premier de ces systèmes, AR1, est encore assez mal connu (Zhao & Houry, 2010). Il peut être activé si la bactérie est placée dans un milieu minimum dépourvu d'acides aminés à un pH de 2,5 après avoir été cultivée dans un milieu LB à pH de 5,5 (Foster, 2004). Ce système est dépendant du facteur σ^s (aussi appelé RpoS ou σ^{38}) qui est une sous-unité sigma de l'ARN polymérase (Hengge-Aronis, 2002). Il est également dépendant de la protéine CRP (cAMP receptor protein) qui induit une répression de ce système par le glucose (Foster, 2004). L'induction du facteur σ^s permet à la cellule de s'adapter aux conditions environnantes et renforce sa résistance aux conditions stressantes. Le facteur σ^s permet l'expression de certains gènes induisant une modification de l'état physiologique de la cellule lui permettant d'affronter les conditions stressantes (acide, choc osmotique...) (Weber *et al.*, 2005). Ce facteur est aussi induit lors du passage de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire. L'ARNm du gène *rpoS* est transcrit en permanence et à un niveau relativement élevé quel que soit l'état de la bactérie. Néanmoins, sa durée de vie est courte et il ne peut être traduit sous sa forme native. Lorsque la cellule passe de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire ou lorsque la cellule est soumise à un (ou plusieurs) stress, l'ARNm du gène *rpoS* subit un réarrangement grâce notamment à l'action de petits ARNs et d'une protéine chaperonne appelée Hfq (Brown & Elliott, 1997 ; Hengge-Aronis, 2002 ; Muffler *et al.*, 1996a ; Muffler *et al.*, 1996b ; Repoila *et al.*, 2003). Cet ARNm peut alors être traduit.

Les 4 autres systèmes de résistance à l'acidité sont eux basés sur l'action d'une enzyme décarboxylase spécifique d'un acide aminé couplée à un antiport permettant l'échange du produit décarboxylé par un nouveau substrat (Zhao & Houry, 2010). Ces systèmes sont :

- le système glutamate-dépendant (AR2),
- le système arginine-dépendant (AR3),
- le système lysine-dépendant (AR4),
- le système ornithine-dépendant (AR5).

La décarboxylation de l'acide aminé permet la consommation d'un proton à l'intérieur du cytoplasme et ainsi de diminuer leur taux. Ainsi, le pH intra-cellulaire remonte. A titre d'exemple, la Figure 7 présente le fonctionnement de ces 4 systèmes.

Figure 7. Systèmes d'acido-résistance dépendant d'acides aminés chez *E. coli* (Zhao & Houry, 2010).



Les principales protéines impliquées dans ces différents systèmes (décarboxylases, antiports), les pH optimums de fonctionnement de ces enzymes et leur rôle en cas de stress acides sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Résumés des mécanismes de résistance à l'acidité (Peng *et al.*, 2011 ; Zhao & Houry, 2010).

Nom du mécanisme	Décarboxylation	Protéines principales et fonctions	pH optimum des décarboxylases	Domaine d'action
AR1 : mécanisme réprimé par le glucose.	_	Facteur σ^S permettant l'expression de protéines impliquées dans une réponse au stress globale.	_	Passage de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire. Réponse à un stress important.
AR2 : système de la glutamate décarboxylase.	Glutamate décarboxylé en γ -aminobutyrate (ou GABA).	GadA et GadB (glutamate décarboxylase – ce système comprend 2 isozymes). GadC (antiport glutamate/GABA). GadE (principal régulateur des opérons <i>gadA</i> et <i>gadB/C</i>).	pH de 4	Système principalement impliqué en cas de stress acide avec pH très faible, impliqué notamment pour la survie lors du passage de la bactérie dans l'estomac : permet la survie de la bactérie à des pH voisin de 2.
AR3 : système de l'arginine décarboxylase.	Arginine décarboxylée en agmatine.	AdiA (arginine décarboxylase). AdiC (antiport arginine/agmatine). CysB (activateur de <i>adiA/C</i>). AdiY (potentiel activateur de <i>adiA/C</i>).	pH de 5	Système principalement impliqué en cas de stress acide avec pH très faible (< 3), impliqué notamment pour la survie lors du passage de la bactérie dans l'estomac, mais

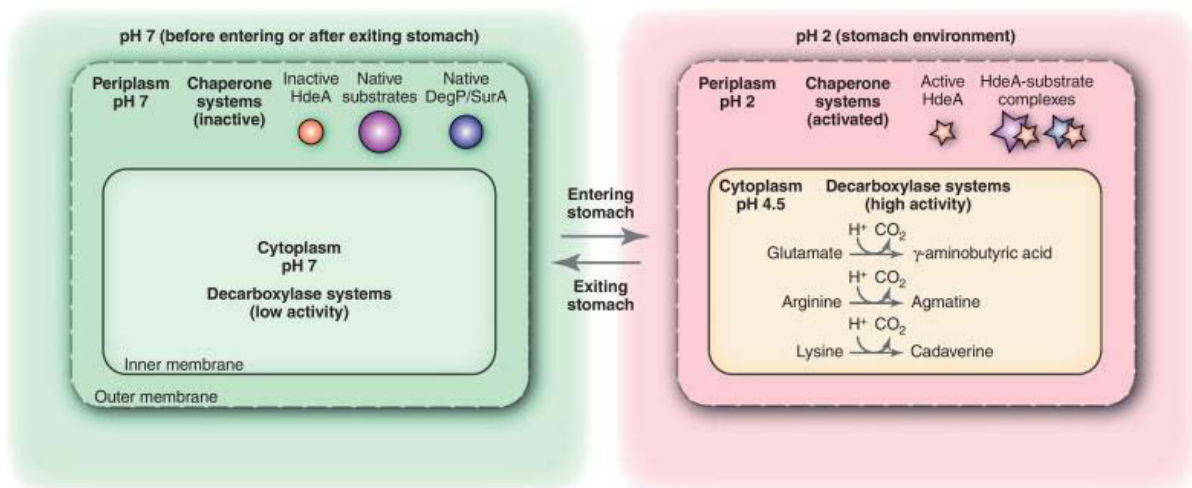
				moins importance que le système AR2.
AR4 : système de la lysine décarboxylase	Lysine décarboxylée en cadaverine.	CadA (lysine décarboxylase). CadB (antiport lysine/cadaverine). CadC (régulateur de l'opéron <i>cadA/B</i>). LysP (lysine perméase régulant CadC)	pH de 5,7	Système pouvant être impliqué dans la régulation du stress acide au cours de la fabrication fromagère.
AR5 : système de l'ornithine décarboxylase.	Ornithine décarboxylée en putrescine	SpeF (ornithine décarboxylase). PotE (antiport ornithine/putrescine)	pH de 6,9	Système pouvant être impliqué dans la régulation du stress acide au cours de la fabrication fromagère, mais très peu étudié à ce jour.

Les systèmes dépendant du glutamate et de l'arginine permettent ainsi aux *E. coli* de survivre dans les milieux extrêmement acides. De plus, d'autres mécanismes de résistance à l'acidité sont nécessaires à la bactérie afin de survivre dans un environnement acide comme l'antiport $1\text{H}^+/2\text{Cl}^-$ CIC permettant d'importer des ions Cl^- afin de rétablir le potentiel membranaire interne négatif tout en expulsant des protons. Le risque de dépolarisation de la membrane est dû à l'accumulation de H^+ à cause de l'acidité ainsi qu'à l'activité des systèmes AR2 ($\text{Glu}^- \rightarrow \text{GABA}$) et AR3 ($\text{Arg}^+ \rightarrow \text{Agm}^{2+}$) (Zhao & Houry, 2010).

Des protéines chaperonnes périplasmiques comme HdeA et B protègent les protéines périplasmiques au cours du passage dans l'estomac ou encore des chaperonnes cytoplasmique comme Hsp31 dépendante de l'activation de σ^5 .

Ces différents mécanismes sont à même de maximiser les chances de survie de la bactérie et de colonisation de l'hôte, jouant ainsi un rôle clef dans la pathogénicité des STEC (Hong *et al.*, 2012) (Figure 8).

Figure 8. Mécanismes de résistance à l'acidité rencontrée dans l'estomac (Hong *et al.*, 2012).



En conclusion, de nombreux facteurs encore inconnus ou dont le rôle n'a pas encore été déterminé semblent intervenir dans le pouvoir pathogène des EHEC.

2.4. Définition française du STEC pathogène

En France, le 25 avril 2008, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) afin d'élaborer une définition des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (STEC) considérées comme pathogènes pour l'homme.

Grace à tous ces éléments, l'avis du 15 juillet 2008, mis à jour le 31 mai 2010 de l'AFSSA (AFSSA, 2008 ; AFSSA, 2010) indique que :

« A ce jour, les souches STEC pathogènes « EHEC typiques majeurs », peuvent être définies selon les critères génétiques suivants :

EHEC O157:H7 = rfbEO157, flicH7, stx1 et/ou stx2, eae-gamma, (OI#122).

EHEC O26:H11 = wzxO26, flicH11, stx1 et/ou stx2, eae-bêta, (OI#122).

EHEC O145:H28 = ihp1O145, flicH28, stx1 et/ou stx2, eae-gamma, (OI#122).

EHEC O103:H2 = wzxO103, flicH2, stx1 et/ou stx2, eae-epsilon, (OI#122).

EHEC O111:H8 = wbd1O111, flicH8, stx1 et/ou stx2, eae-thêta, (OI#122).

En conclusion, il est important de souligner le caractère temporaire de cette définition. Celle-ci devra être révisée en fonction des nouvelles observations cliniques, des résultats d'investigations épidémiologiques, en fonction des résultats des projets de recherche et du développement de méthodes fines. En effet, en suivant *stricto sensu* cette définition, la souche *E. coli* O104:H4 responsable d'une des épidémies les plus importantes et mortelles liée à l'ingestion de souches STEC n'aurait pas été identifiée comme hautement pathogène. De plus, cette définition fait abstraction de l'expression des gènes de virulence. Il est probable que certaines souches puissent posséder les gènes *stx* sans pouvoir les exprimer.

3. Aspect clinique et symptômes liés aux EHEC

Toute personne ayant ingéré une souche EHEC peut développer des symptômes, bien que les enfants de moins de 5 ans et les personnes de plus de 60 ans sont plus sensibles et plus

gravement touchés par ces infections (Karmali *et al.*, 2010). De nombreux facteurs peuvent influencer cette sensibilité : état de santé, le nombre de récepteurs aux toxines Stx et les traitements médicaux suivis (antibiotique...). Plusieurs études ont démontré que la dose infectieuse minimale des EHEC semble faible (inférieure à 100 bactéries pathogènes par portion alimentaire), mais celle-ci peut varier en fonction des caractéristiques de la souche, des sources de contamination incriminées (pH...), et de la sensibilité de l'hôte (Griffin & Tauxe, 1991 ; Strachan *et al.*, 2001 ; Teunis *et al.*, 2004 ; Tilden *et al.*, 1996).

3.1. La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 (Tarr, 1995). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile (Griffin & Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). La période d'incubation, de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour certaines autres diarrhées infectieuses (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 si nécessaire jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient (Su & Brandt, 1995). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée et pourrait même être un facteur de stress à même de déclencher le cycle lytique des prophages Stx et donc de stimuler la production de Shiga-toxines pouvant alors déclencher de sévères complications.

3.2. Le SHU

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) a été décrit pour la première fois en 1955 par Gasser *et al.*, (1955) mais le lien entre la survenue d'un SHU et une infection intestinale par des EHEC n'a été établi qu'en 1983 (Karmali *et al.*, 1983).

Le SHU causé par les Shiga-toxines est caractérisé par la lésion histologique de microangiopathie thrombotique correspondant à des lésions endothéliales conduisant à une agrégation plaquettaire diffuse puis à l'occlusion des lumières artériolaires par des thrombi fibrineux (Tarr *et al.*, 2005).

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.

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 & Tauxe, 1991).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Siegler, 1995 ; Siegler & Oakes, 2005). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre une enquête française qui indique que 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 en sont décédés (Decludt *et al.*, 2000).

Ce tableau clinique est caractéristique et ne pose généralement pas de problème de diagnostic.

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%. Il consiste essentiellement en des apports nutritionnels et hydro-électrolytiques par voie orale, éventuellement entérale au moyen d'une sonde gastrique, voire parentérale à l'aide de solutions isotoniques dans les cas les plus graves.

Malgré une guérison apparente, la plupart des patients sont susceptibles de développer des complications tardives. Ainsi, les patients ayant présenté un SHU avec une anurie de plus d'une semaine doivent faire l'objet d'une surveillance à très long terme (Nangaku *et al.*, 2007).

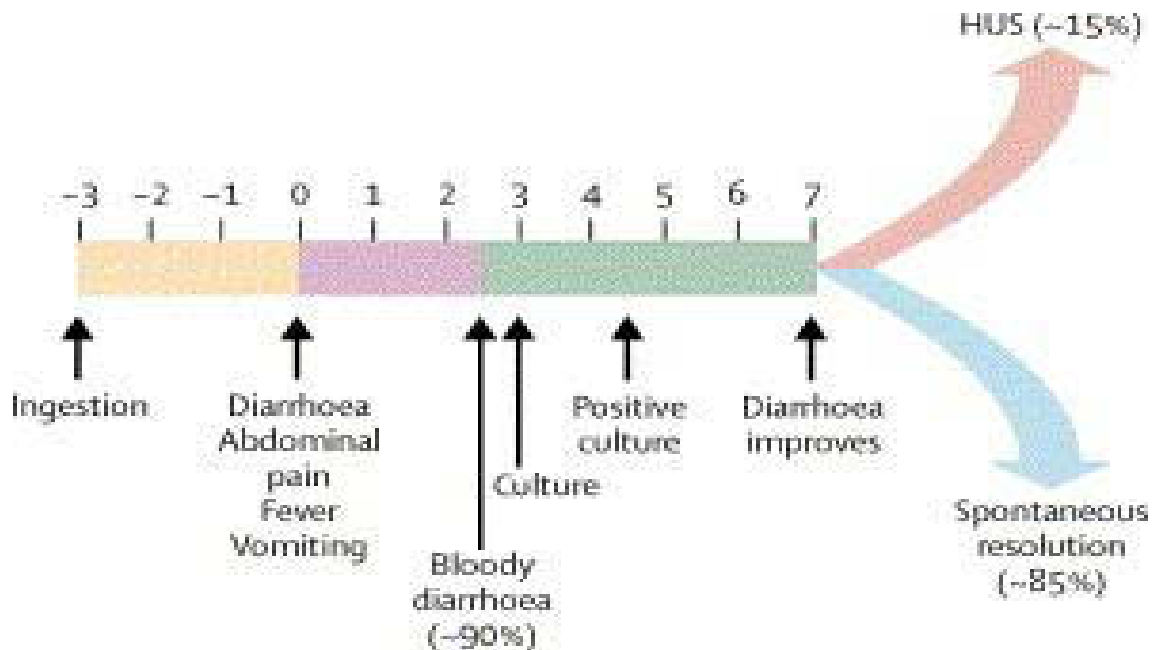
La Figure 9 présente l'évolution clinique générale en cas d'ingestion de EHEC.

3.3. Le 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 est rare et survient le plus souvent chez l'adulte (pic de fréquence chez les femmes autour de 40 ans). Il est exceptionnel chez l'enfant et la personne âgée. Le PTT se caractérise par une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, une atteinte neurologique prédominante (modifications du comportement, paresthésie, aphasie, troubles visuels, coma) et des anomalies rénales inconstantes (insuffisance rénale présente dans environ la moitié des cas) (Tarr *et al.*, 2005).

Figure 9. Evolutions cliniques après ingestion de souches EHEC (Tarr *et al.*, 2005).



4. Epidémiologie

En France, les infections dues aux EHEC sont recensées indirectement par la surveillance des cas de SHU. Chaque pays possède un système qui lui est propre (AFSSA, 2003). Par exemple, en France, la surveillance des infections dues aux EHEC est basée, depuis 1996, sur les données de recensement des SHU observés chez les enfants âgés de moins de 15 ans et repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires. Néanmoins, la non-prise en compte des symptômes ne nécessitant pas d'hospitalisations (diarrhées hémorragiques...) entraîne une sous-estimation des cas d'infections provoqués par les EHEC. Comme pour les autres pays européens, l'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France s'échelonne à environ moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans (King *et al.*, 2009a). En France, depuis 1996, des cas sporadiques de SHU avec une recrudescence saisonnière pendant la période estivale ont été enregistrés, notamment entre les mois de juin et de septembre (Haeghebaert *et al.*, 2003). Cette augmentation estivale a aussi été observée dans d'autres pays: Angleterre et Pays de Galles (Anon, 2000), Belgique, Pays-Bas et Allemagne (Van de Kar *et al.*, 1996), ou encore en Amérique du Nord (Michel *et al.*, 1999). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène : il a été mis en évidence une relation entre la densité du bétail et les infections en *E. coli* O157:H7 au cours de l'été ; saison où les populations sortent plus facilement dans la nature et où les troupeaux sont en pâturages, augmentant ainsi les contacts humains/bovins. De plus, les enfants de moins de 5 ans vivant dans des zones à forte densité de bétail présentent un risque important d'infection par *E. coli* O157:H7 (Friesema *et al.*, 2010). Certains auteurs ont aussi pu démontrer un lien direct entre température, UV et induction du phage Stx (Yue *et al.*, 2012). Les conditions estivales pourraient donc favoriser l'induction et la multiplication de ces phages et donc la formation de nouveaux STEC par transfert horizontal du gène *stx*. Pour finir, la rupture de la chaîne du froid et les conditions d'abattage en période estivale (travail à température ambiante dans les abattoirs, intérimaires peu/pas qualifiés...) peuvent également expliquer ce phénomène.

4.1. Le réservoir animal

Les études d'épidémiologies analytiques ont permis d'identifier les réservoirs des souches STEC : bien que des souches STEC potentiellement pathogènes aient été retrouvées chez un grand nombre d'espèces animales (y compris chez l'homme), les ruminants, et en particulier les bovins semblent être les principaux réservoirs des STEC (Friesema *et al.*, 2010 ; Gyles, 2007). Chez ces espèces, le portage et l'excrétion de STEC sont asymptomatiques. En effet, les bovins ne possèdent pas les récepteurs Gb3 et ne présentent, par conséquent, aucun symptôme lorsque les STEC transitent dans leur tube digestif. Les bovins sont dits porteurs sains (Karmali *et al.*, 2010) et peuvent donc être à l'origine d'épidémies d'infections sévères chez l'homme. La prévalence des STEC dans le réservoir animal sera plus précisément décrite dans le chapitre 2 de ce mémoire.

Des STEC, appartenant au sérotype O157 mais aussi à d'autres sérotypes associés à des cas de pathologie chez l'homme tels que O5, O6, O75, O91, O128 ou O146, ont été fréquemment mis en évidence dans les fèces des bovins du monde entier (Bettelheim, 2007). Dans de nombreux pays, les bovins et tout particulièrement les veaux, sont porteurs de STEC (Gyles, 2007). Des STEC potentiellement pathogènes pour l'homme ont aussi été retrouvés dans des aliments qui n'étaient pas originaires de bovins. Il s'agit de denrées alimentaires d'origine ovine (viande, mais aussi lait et produits laitiers) (Bettelheim, 2007 ; Chapman *et al.*, 2001). Certains STEC ont de plus été isolés chez des caprins (Martin & Beutin, 2011). Par contre, les porcs ne semblent pas constituer un réservoir très important de STEC pathogènes pour l'homme (Caprioli *et al.*, 2005).

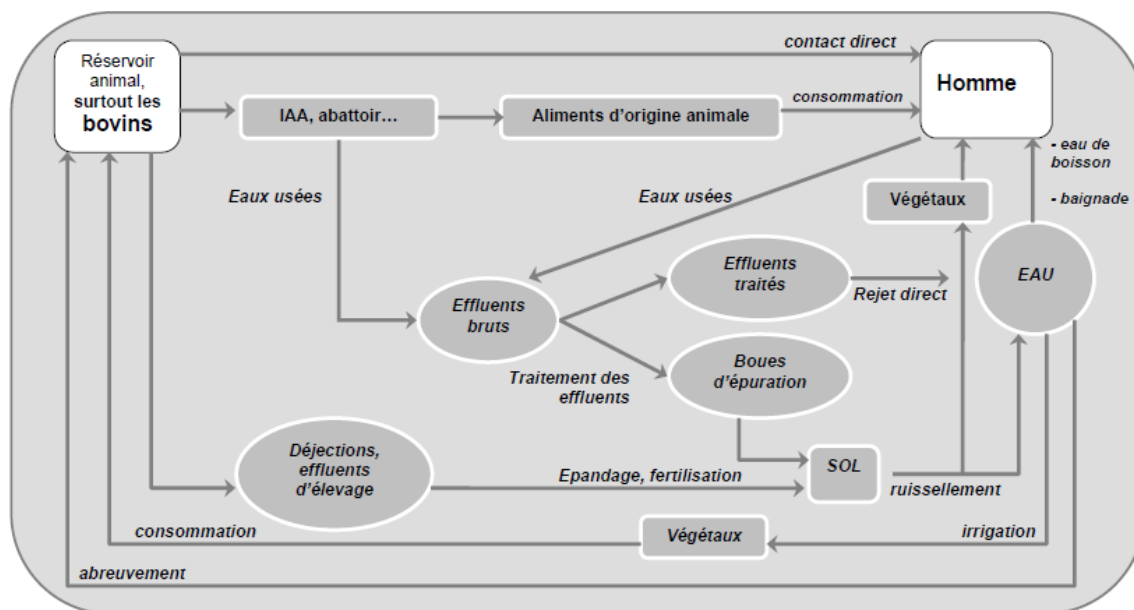
En ce qui concerne les oiseaux, des souches de STEC ont pu être mises en évidence chez les volailles (Dutta *et al.*, 2011). Des STEC O157 ont aussi été détectés dans des denrées alimentaires issues de volailles (Chinen *et al.*, 2009). Des STEC ont déjà été isolés dans les fèces d'oiseaux sauvages (Hughes *et al.*, 2009).

Bien que toutes les STEC isolées chez l'animal ne soient pas systématiquement de réelles EHEC, les ruminants pourraient jouer un rôle non-négligeable dans la dissémination des souches dans l'environnement (Howie *et al.*, 2003).

4.2. Les modes de transmission

Les études d'épidémiologies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC. La Figure 10 présente les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme.

Figure 10. Flux potentiels des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme (AFSSA, 2003).



Les principaux modes de transmission des STEC à l'homme sont :

- la consommation d'aliments contaminés insuffisamment cuits ou crus. Elle est la principale source de contamination humaine (la moitié des épidémies à EHEC). Les produits carnés d'origine bovine sont à l'origine d'un grand nombre d'infections à *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozand & Montet, 2001) suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts *et al.*, 1995) ou une ingestion crue. La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en cause (AFSSA, 2003 ; Paton *et al.*, 1996). Bien que plus rare, la consommation de viande de bœuf hachée crue contaminée de manière croisée par une mauvaise hygiène des mains du personnel a aussi été décrite (Nataro & Kaper, 1998).

Les STEC sont généralement introduits dans la chaîne alimentaire au moment de l'abattage. Une mauvaise ou l'absence de ligature du rectum pourrait laisser fuir les excréments de

l'animal. L'étape de l'habillage est également sensible puisque le cuir contaminé des animaux pourrait entrer en contact avec la carcasse. Enfin, l'étape de l'éviscération, si elle est mal pratiquée, peut entraîner une rupture de l'appareil digestif libérant ainsi le contenu de l'intestin. Les étapes de transformation peuvent également être une source de contamination (contaminations croisées).

Le lait et les produits laitiers pasteurisés ou non ont également été à l'origine d'épidémies (Baylis, 2009). Ces cas seront largement détaillés dans le chapitre 2 de ce mémoire.

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

- La transmission de personne à personne. Le portage sain humain de STEC existe (Silvestro *et al.*, 2004) mais semble rare et transitoire (Stephan & Untermann, 1999). Une étude de 2 ans portant sur des travailleurs de ferme non-malades de 3 régions distinctes d'Angleterre a montré que 3,3% des échantillons de sérum des personnes considérées possédaient des anticorps anti-O157, acquis suite à un contact prolongé avec ces antigènes dans l'environnement de la ferme. Ces personnes sont considérées comme des porteurs sains (Quilliam *et al.*, 2012). La majorité des cas de transmission de personne à personne des STEC résulte d'un contact avec les malades. Cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Sugiyama *et al.*, 2005), les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) mais aussi dans les centres pénitenciers (CDC, 2012). Ce mode de transmission peut être aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles et dans les hôpitaux.

- L'ingestion d'eau contaminée. La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infections (Chalmers *et al.*, 2000 ; Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Holme, 2003 ; Mannix *et al.*, 2007). Depuis ces dix dernières années, le nombre d'épidémies associées aux réseaux publics d'eau potable a nettement diminué, notamment grâce à la mise en place de mesures préventives et curatives appropriées. Dans le cas des réservoirs d'eau dédiés à une consommation

privée, ces mesures ne sont pas toujours appliquées. Du fait de leur insalubrité et de leur localisation (en aval de terres agricoles pâturées par des ruminants ou fertilisées par les effluents d'élevages), ces réservoirs d'eau peuvent être contaminés par les eaux de percolation et/ou de ruissellement, notamment à la suite d'importants événements pluvieux. Entre 1971 et 2000, des souches de *E. coli* pathogènes ont été retrouvées dans 6% des épidémies dues à l'ingestion d'eau de boisson contaminée au USA (Craun *et al.*, 2005). Une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 a fait plus de 2 300 malades dont 7 morts au Canada en Mai 2000 suite à la consommation d'eau de boisson (Hrudey *et al.*, 2003). De plus, des souches de *E. coli* O157:H7 ont été isolées dans des eaux de surfaces ou des eaux usées au Canada (Jokinen *et al.*, 2010). Plusieurs épidémies liées à l'ingestion de végétaux contaminés par des EHEC ont aussi été recensées suite à l'irrigation des cultures par des eaux contaminées, à l'épandage de fumier ou de lisier d'animaux contaminés (Ackers *et al.*, 1998). Certaines études suggèrent même que l'eau d'irrigation pourrait contaminer les végétaux par leurs racines (Wachtel *et al.*, 2002). L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle (Ackman *et al.*, 1997 ; Cransberg *et al.*, 1996 ; Ihekweazu *et al.*, 2006 ; Keene *et al.*, 1994 ; Paunio *et al.*, 1999) ou encore dans une piscine (Brewster *et al.*, 1994 ; Friedman *et al.*, 1999) a souvent été incriminée dans les cas de contamination humaine par les STEC. Cependant, aux Etats-Unis, les épidémies à *E. coli* O157:H7 d'origine hydrique sont principalement associées aux eaux issues de lacs ou rivières, en raison de la sensibilité des souches, notamment à la chloration des eaux de piscines (Craun *et al.*, 2005).

- Le contact avec des animaux (notamment les bovins). La transmission de *E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques (O'Brien *et al.*, 2001a) mais aussi lors d'épidémies (CDC, 2012 ; Crump *et al.*, 2002 ; Ihekweazu *et al.*, 2012). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 était plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux (Evans *et al.*, 2000).

Il a été démontré que des souches *E. coli* O157:H7, mais aussi de STEC O26:H11 et O111 sont capables de survivre une centaine de jours dans les fèces de bovins (Duffy, 2003 ; Fremaux *et al.*, 2008a ; Fremaux *et al.*, 2008b ; Fremaux *et al.*, 2010 ; Fukushima *et al.*, 1999). De même,

les STEC sont capables de survivre plusieurs mois dans le sol (Fremaux *et al.*, 2010). Or, le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals (Crampin *et al.*, 1999) ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden *et al.*, 2002). En Ecosse, des sols souillés ont été impliqués dans 11% des infections environnementales à *E. coli* O157:H7 (Strachan *et al.*, 2006).

4.3. Principales épidémies

La première épidémie recensée a eu lieu aux USA en 1982 : 46 personnes ont présenté des symptômes suite à la consommation de viande hachée de bœuf contaminée par *E. coli* O157:H7 (Riley *et al.*, 1983). La plus importante épidémie mondiale a été liée à la présence du sérotype O157:H7 dans des germes de radis blanc ayant été consommés au Japon et ayant conduit à plus de 9 000 malades et 12 décès (Michino *et al.*, 1999).

En Ecosse, entre 1994 et 2003, sur 35 épidémies à *E. coli* O157:H7 identifiées, 19 (54%) étaient associées à des sources environnementales de contamination (Strachan *et al.*, 2006). Soulignons que 21% des épidémies investiguées présentaient une source de contamination inconnue (Rangel *et al.*, 2005). Le Tableau 4 retrace les principales épidémies dans le monde dues aux STEC depuis 1982. Les épidémies ayant impliqué des produits laitiers seront plus largement décrites dans le chapitre 2 de ce mémoire.

Tableau 4. Principales épidémies dues aux STEC dans le monde depuis 1982.

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nb de malades (SHU et décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Référence
1982	USA	O157:H7	46	Viande hachée de bœuf	(Riley <i>et al.</i> , 1983)
1984	USA	O157:H7	34 (4 décès)	Hamburger	(Ryan <i>et al.</i> , 1986)
1991	Canada	O157:H7	152 (22 SHU et 2 décès)	Viande de caribou et bœuf haché	(Orr <i>et al.</i> , 1994)

1992-93	USA	O157:H7	501 (45 SHU et 3 décès)	Hamburger	(Bell <i>et al.</i> , 1994)
1994	USA	O157:H7	23 (2 SHU)	Salami sec	(Tilden <i>et al.</i> , 1996)
1994	Angleterre	O157:H7	70 (9 SHU et 1 PTT)	Lait pasteurisé	(Upton & Coia, 1994)
1995	USA	O157:H7	>70 (1 SHU)	Laitue	(Ackers <i>et al.</i> , 1998)
1995	Australie	O111:H7	23 SHU (1 décès)	Saucisse sèche fermentée	(Paton <i>et al.</i> , 1996)
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	Plats préparés à base de viande crue (bœuf et porc)	(Stevenson & Hanson, 1996)
1996	Japon	O157:H7	9451 (12 décès)	Radis blanc	(Michino <i>et al.</i> , 1999)
1996	Canada	O157:H7	70 (14 SHU et 1 décès)	Jus de pomme non pasteurisé	(Cody <i>et al.</i> , 1999)
1996	USA	O157:H7	14 (3 SHU)	Jus de pomme frais non pasteurisé	(Hilborn <i>et al.</i> , 2000)
1996	Ecosse	O157:H7	512 (34 SHU et 17 décès)	Viande de bœuf	(Cowden <i>et al.</i> , 2001)
1997	Ecosse	O157:H7	37	Gâteau à la crème	(O'Brien <i>et al.</i> , 2001b)
1997	USA	O157:H7	108 (4 SHU)	Germe de luzerne	(Breuer <i>et al.</i> , 2001)
1998	USA	O157:H7	55	Fromage frais caillé	(CDC, 2000)
2000	Canada	O157:H7	2300 (7 décès)	Eau de boisson	(Hrudey <i>et al.</i> , 2003)
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé	(Baylis, 2009)
2001	Canada	O157:H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non	(McIntyre <i>et al.</i> ,

				pasteurisé	2002)
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	Viande de mouton	(Espié <i>et al.</i> , 2006b)
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	Viande de bœuf	(King <i>et al.</i> , 2009b)
2005	France	O26	6 SHU	Camembert	(Espié <i>et al.</i> , 2006c)
2005	France	O157	2 (1 SHU)	Fromage au lait cru de chèvre	(Espié <i>et al.</i> , 2006a)
2005	Suède	O157:H7	120 (7 SHU)	Laitue	(Söderström <i>et al.</i> , 2005)
2006	Norvège	O103:H25	17 (10 SHU et 1 décès)	Saucisse fermentée	(Sekse <i>et al.</i> , 2009)
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU et 3 décès)	Epinards	(CDC, 2006)
2009	France	O123:H7	2 (1 SHU)	Hamburger	(King <i>et al.</i> , 2010a)
2010	USA	O145	19	Laitue	(CDC, 2010)
2011	Allemagne	O104:H4	3816 (845 SHU et 54 décès)	Germes de Fénugrec	(Beutin & Martin, 2012)
2011	France	O104:H4	15 (9 SHU)	Germes de Fénugrec	(Grad <i>et al.</i> , 2012)
2011	France	O157:H7	19 SHU	Viande hachée de bœuf	(InVS, 2011)
2012	France	O157:H7	4 SHU	Viande hachée de bœuf	(InVS, 2012)

La plupart des ces épidémies ont été liées à des souches classiques de EHEC, et particulièrement au sérotype O157:H7, portant les gènes *eae* et *stx*. A l'heure actuelle, plus

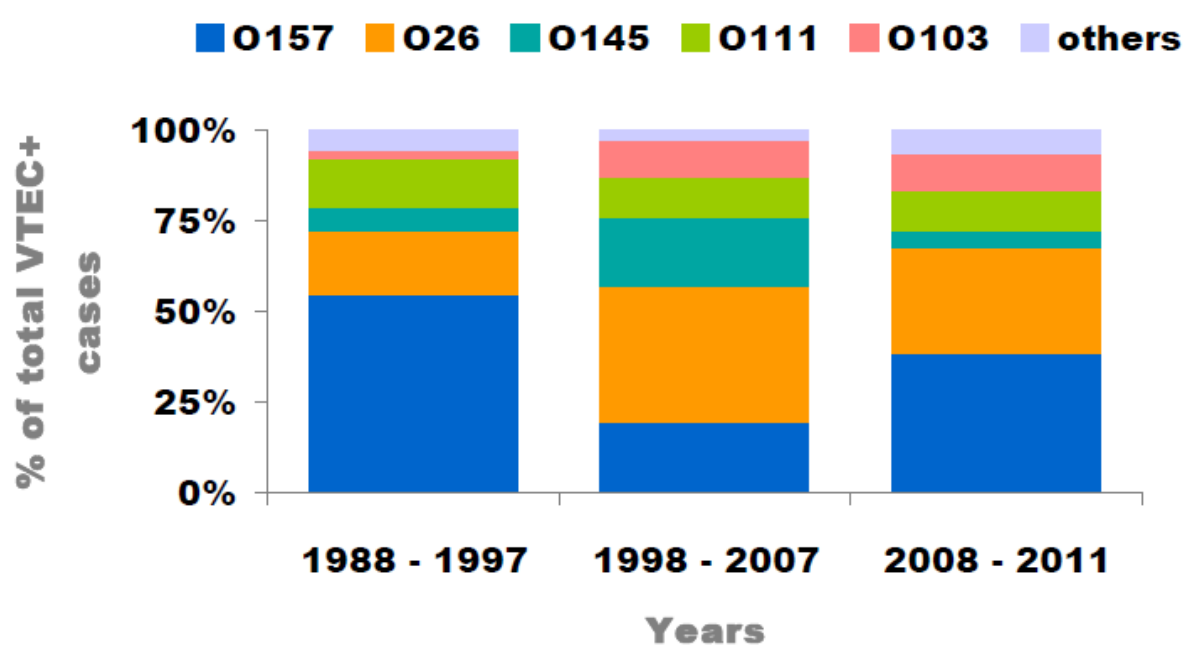
de 100 sérotypes différents de EHEC ont été responsables d'épidémies. Le sérotype O157:H7 a longtemps été le plus incriminé dans les cas d'épidémies et le plus souvent isolé dans diverses matrices. Ceci s'explique notamment par l'implication de ce sérotype dans des épidémies, mais aussi par le fait que *E. coli* O157:H7 a longtemps été le seul recherché dans certains pays jusqu'à la fin des années 2000. La plupart des méthodes de détection et d'isolement ont été mises au point pour ce sérotype, facilitant sa recherche. De plus, les souches appartenant à ce sérotype présentent des caractéristiques phénotypiques qui leur sont propres et qui les rendent plus facilement identifiables que les autres STEC : absence de fermentation du sorbitol et absence d'activité de la β -glucuronidase (Cebula *et al.*, 1995). Notons néanmoins que certaines souches de *E. coli* O157:H7 impliquées dans des cas de pathologie chez l'être humain présentent une activité β -glucuronidase et fermentent le sorbitol (Karch & Bielaszewska, 2001). Les récents progrès en matière de milieux d'enrichissement (Savoie *et al.*, 2011 ; Verstraete *et al.*, 2010), de géloses sélectives (Possé *et al.*, 2008) ou encore les méthodes de détection par RT-PCR (Madic *et al.*, 2010 ; Perelle *et al.*, 2004) ont permis de mettre en évidence une très forte implication des EHEC non-O157:H7 dans les épidémies (Tableau 5 et Figure 11).

L'épidémie due à une souche d'*E. coli* O104:H4 en Allemagne ainsi qu'en France en 2011 se distingue particulièrement du fait de la souche impliquée. En effet, cette souche épidémique appartenait au sérotype O104:H4 et possédait le gène *stx2* qui code la Shiga-toxine de type 2. Cette souche ne possédait pas le gène *eae* mais portait le gène *aggR* présent sur le plasmide pAA caractéristique des *E. coli* entéro-agrégatives. Cette souche présentait un profil de multi-résistance aux antibiotiques grâce à un plasmide codant pour des β -lactamases à spectre étendu (ESLB) (Grad *et al.*, 2012).

Tableau 5. Prévalence des différents sérogroupes de EHEC impliqués dans les cas de SHU en France (AFSSA, 2010 et données inVS).

Sérogroupes	1996-2006 % de cas	2007 % de cas	2008 % de cas	2009 % de cas
O157	83	58	69	28
O26	6	7	7	8
O145	2	4	5	3
O103	3	5	2	2
O111	1	2	0	3
O121	0	5	1	3
O91	1	0	1	0
O55	1	0	1	2
autres	3	19	14	51

Figure 11. Prévalence des différents sérogroupes de EHEC impliqués dans des cas de SHU en Italie (Scavia *et al.*, 2012).



Les souches *E. coli* O104:H4 isolées suite à l'épidémie Française de Juin 2011 présentaient un profil PFGE similaire à celles identifiées et caractérisées dans le cadre de l'épidémie observée en mai-juin en Allemagne de cette même année. Néanmoins, plusieurs mutations au niveau nucléotidique avaient pu être mises en évidence après séquençage du génome de certaines de ces souches isolées de patients en Allemagne et en France (Grad *et al.*, 2012). Cette forte homologie des isolats combinée au caractère rare de la souche à l'origine de ces épidémies, ont laissé supposer que ces deux événements sont liés à une source commune. L'enquête épidémiologique avait identifié des germes de fénugrec comme étant la source la plus probable de l'épidémie (ANSES, 2011b).

Les épidémies provoquées par cet *E. coli* O104:H4 ont mis en évidence les menaces imprévisibles que font planer les STEC sur la santé humaine et l'enjeu important que représente la connaissance de leur comportement dans les aliments afin de pouvoir anticiper toutes épidémies potentielles.

En conclusion, au cours des années 80, la plupart des infections consécutives aux EHEC étaient essentiellement associées à la consommation de denrées d'origine animale. Les sources d'infections à EHEC ont considérablement évolué depuis ces dix dernières années. L'ingestion de végétaux ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine. Ceci s'explique sans doute par :

- une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination lors d'une épidémie à EHEC,
- des méthodes d'investigation de plus en plus performantes (PFGE, MLST, MLVA, séquençage),
- une multiplication des élevages intensifs bovins,
- et par une modification du régime alimentaire chez l'homme, avec une consommation accrue de fruits, légumes et aliments crus dans les pays développés.

5. Recherche d'E. coli O157:H7 et des STEC dans les aliments

Le lait et les produits laitiers peuvent être un vecteur de contamination par les STEC. Ils ont été impliqués dans plus d'une dizaine d'épidémies alimentaires dans le monde depuis 2005 et il paraît utopique à l'heure actuelle de pouvoir éliminer totalement les différentes sources de contamination qui ont été décrites en dépit de l'application de mesures d'hygiène correctes. Afin de prévenir les risques de contaminations humaines par ces bactéries, en complément de toutes les mesures décrites précédemment, il est donc indispensable de pouvoir les détecter rapidement dans les aliments.

A ce jour, il n'existe pas de critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires concernant la détection des STEC dans les matrices alimentaires (excepté pour les graines germées) (JO L332 du 7.12.2007).

Comme cela est indiqué dans la Saisine n°2010-SA-0031 de l'ANSES (ANSES, 2011a) : « Dans son considérant 14, le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié se réfère à un avis du Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique (CSMVSP) qui conclut que la mise en place d'une norme microbiologique pour le sérotype O157 n'entraînerait pas de réduction sensible du risque d'infection grave à EHEC pour les consommateurs en raison de la présence sporadique et de la faible prévalence globale de la bactérie dans les denrées alimentaires concernées. Ces données de prévalence n'ayant pas significativement évolué depuis la parution de cet avis (EFSA, 2007; EFSA, 2009 ; EFSA, 2010 ; Hussein, 2007), les conclusions du considérant 14 ne sont actuellement pas à remettre en cause pour les filières considérées à risque.

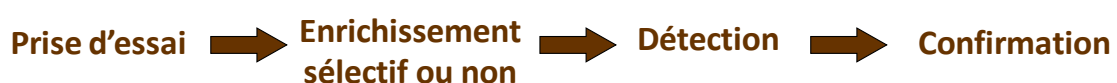
Comme il est mentionné dans l'avis du CSMVSP, si cette prévalence devait augmenter, la mise en place d'un critère microbiologique deviendrait un moyen efficace de maîtrise du risque. Cependant, un critère microbiologique serait à considérer pour tous les sérotypes présentant un danger potentiel pour les consommateurs et non uniquement pour le sérotype O157. Il est également important de mentionner l'absence à ce jour d'un outil

analytique performant dont la mise en œuvre simple et accessible permettrait de rechercher l'ensemble des STEC potentiellement pathogènes dans les produits alimentaires, en particulier pour les sérotypes autres qu'O157:H7 et qui permettrait de quantifier l'expression des facteurs de virulence qui jouent un rôle prépondérant dans la pathogénicité de ces bactéries. Dans une situation d'augmentation de prévalence, la modélisation mathématique permettra d'apprécier quantitativement l'effet de la mise en place d'un critère microbiologique, mais également de définir plus précisément les plans d'échantillonnage à suivre, en fonction des niveaux de prévalence observés dans les produits. Il est cependant important de rappeler que, quelle que soit la situation, « *il ne faut pas confondre la liste des dangers, à définir dans le cadre du PMS, et les critères présents dans le règlement. L'absence de critère réglementaire ne signifie pas absence de danger à prendre en compte* ». »

A ce titre, le « paquet hygiène » (règlement Européen) impose aux producteurs de mettre sur le marché des produits alimentaires indemnes de toute contamination. Les fabricants de fromages au lait cru sont eux fortement encouragés à mettre tout en œuvre pour détecter les STEC dans leurs produits. Par ailleurs, l'ANSES a émis un avis définissant génétiquement les STEC considérées comme hautement pathogènes pour l'homme (Saisine n°2010-SA-0031 liée à la saisine n°2008-SA-0122) (AFSSA, 2008 ; AFSSA, 2010 ; ANSES, 2011a) comme cela a été précisé dans le chapitre 1. En France, le focus est mis sur les STEC possédant concomitamment les gènes *stx* et *eae* de sérotype O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7. Il y a donc un risque de ne pas détecter certaines souches extrêmement pathogène comme *E. coli* O104:H4. D'autres pays comme l'Allemagne recherchent tous les STEC quel que soit leur sérotype.

De manière générale, en microbiologie alimentaire, le protocole classique de recherche des STEC dans les aliments suit toujours le même schéma (Figure 12).

Figure 12. Protocole simplifié de recherche des STEC.



Tout d'abord, un échantillon (ou prise d'essai) est prélevé. Il est important de souligner la difficulté de mise en place de plan d'échantillonnage pour les matrices fromagères. En effet, le taux de contamination étant très faible (environ 1 UFC/mL de lait), la contamination de ces produits par les STEC est très hétérogène (Baylis, 2009). La prise d'essai et l'échantillonnage s'avèrent donc être crucial en ce qui concerne la recherche des STEC dans un fromage et représente une étape critique pouvant facilement biaiser l'analyse : l'analyse d'une portion de 25 g d'un seul fromage ne pourra, à elle seule, refléter une production complète de fromage. Ensuite, l'étape d'enrichissement (sélectif ou non) à l'aide d'un bouillon nutritif permet à la bactérie recherchée de se multiplier avant l'étape de détection qui peut être aussi bien immunologique, phénotypique que génétique. Cette étape de détection permet l'obtention d'un résultat positif présomptif (une suspicion) ou négatif (arrêt des analyses). En cas de résultat positif, la présence de la bactérie cible est suspectée (résultat présomptif) et une étape supplémentaire s'ajoute donc au protocole : l'étape de confirmation. Cette dernière permet de confirmer la présence de la bactérie suspectée dans l'aliment en déterminant son genre, son espèce et les facteurs de virulence qu'elle porte. Cette étape de confirmation est donc en quelque sorte la plus critique du protocole puisqu'elle détermine la dangerosité de la souche présente et donc le risque encouru en cas de consommation de l'aliment contaminé.

La méthode privilégiée au niveau européen pour la recherche des STEC dans les aliments consiste à mettre le focus sur les sérotypes les plus fréquemment impliqués dans les épidémies comme les sérotypes O157:H7, O26:H11 (...) après avoir détecté la présence concomitante des gènes *stx* et *eae* dans une même matrice. Par contre, les aliments contaminés par des sérotypes moins fréquemment associés à des pathologies chez l'être humain, mais qui peuvent s'avérer extrêmement dangereux comme *E. coli* O103:H25 (L'Abée-Lund *et al.*, 2012) et *E. coli* O104:H4 (Beutin & Martin, 2012), risquent d'échapper à ces méthodes sélectives.

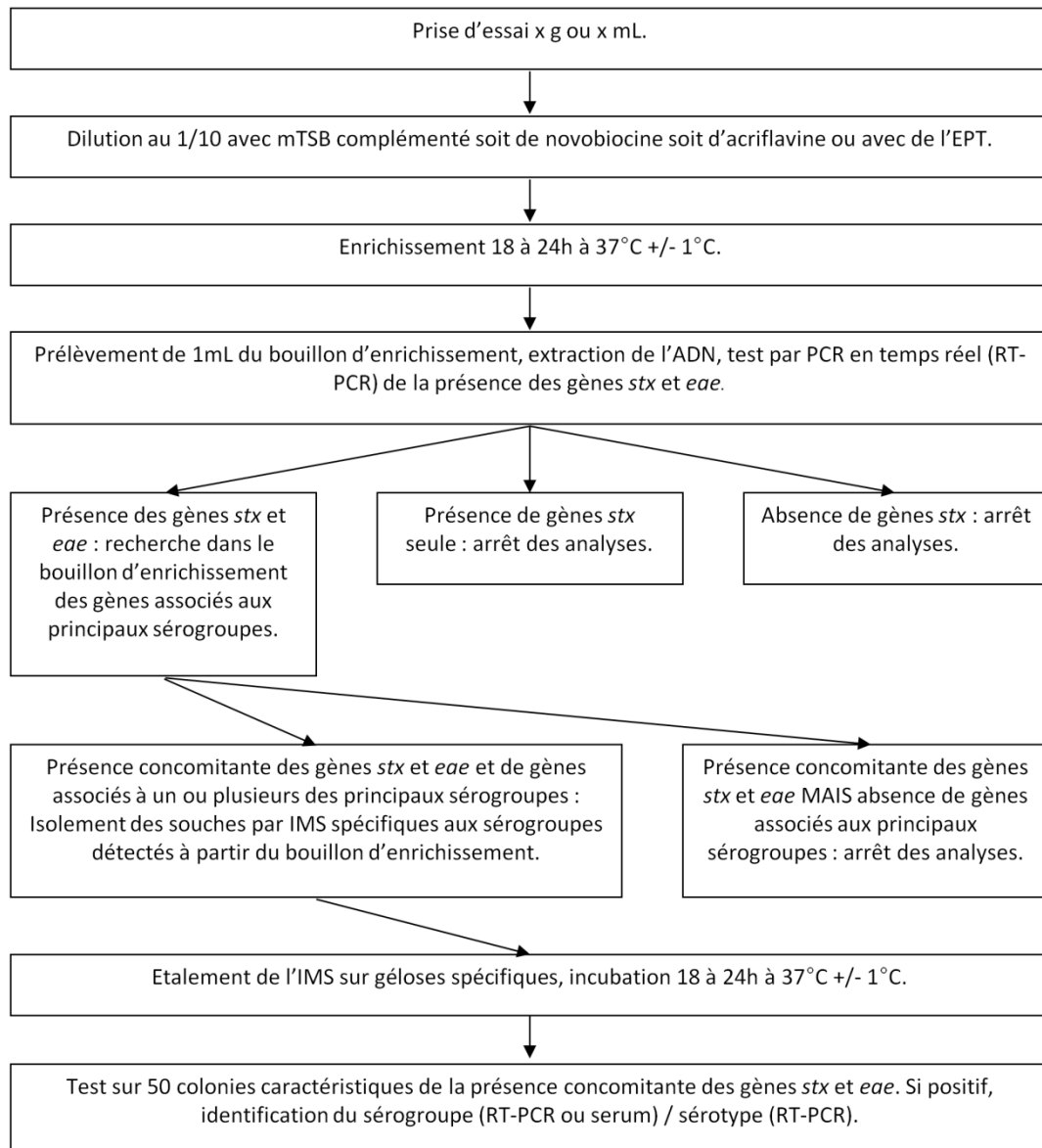
Jusqu'à récemment, la seule norme existante était spécifique à la détection d'*E. coli* O157:H7. Historiquement, seul ce sérotype était recherché : la norme NF EN ISO 16654 :2001 (« Méthode horizontale pour la recherche des *E. coli* O157 ») détaille une méthode destinée à détecter *Escherichia coli* appartenant au séro groupe O157 dans les

aliments. *E. coli* O157:H7 étant le sérotype de STEC le plus impliqué dans les épidémies et les cas de pathologies humaines, de nombreuses méthodes alternatives validées AFNOR permettant la détection de ce sérotype sont commercialisées.

Mais au fil du temps, la définition des STEC pathogènes a évolué, d'autres sérotypes se révélant tout aussi dangereux. Ainsi, pour la détection des souches non-O157, un projet de spécification technique ISO/CEN a été adopté à l'ISO (ISO-TS 13136). Ce projet propose une méthode horizontale pour la détection des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) (Figure 13). Cette méthode repose sur la recherche concomitante des gènes *stx* et *eae* dans une même matrice. Si ces 2 gènes sont présents, alors une recherche des gènes spécifiques de certains sérogroupes est effectuée. Actuellement, en France, les sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145 sont recherchés, mais cette méthode peut s'étendre la recherche d'autres sérogroupes. Les échantillons positifs pour les gènes *stx*, *eae*, et les gènes spécifiques de séro groupe (O157 et/ou O26 et/ou O103 et/ou O111 et/ou O145), sont soumis à une étape supplémentaire afin d'isoler la souche STEC. La méthode a été recommandée par l'EFSA pour la détection des STEC O157 et non-O157 dans les échantillons de denrées alimentaires.

Il existe de nombreuses méthodes publiées ou commercialisées afin de détecter les STEC. Le but de ce paragraphe est de décrire dans les grandes lignes le protocole de détection des STEC. Les différentes étapes de ce protocole appliqué aux matrices issues de produits laitiers seront décrites en mettant le focus sur les avantages, mais aussi les limites de ces différentes méthodes.

Figure 13. Diagramme simplifié représentant la procédure de recherches des STEC selon la norme ISO-TS 13136.



5.1. L'enrichissement des matrices alimentaires

L'enrichissement est une étape importante lors de la détection de micro-organismes dans les aliments. En effet, la plupart des méthodes de détection utilisées à l'heure actuelle nécessitent une étape d'enrichissement, étant donné les faibles taux de bactéries pathogènes retrouvés dans les échantillons. L'étape d'enrichissement consiste à prélever

une quantité donnée d'échantillon auquel est ajouté un bouillon d'enrichissement sélectif ou non. Ce mélange est ensuite incubé à la température optimum de croissance des bactéries cibles pendant une certaine durée. Cette étape d'enrichissement permet donc, d'une part de favoriser la croissance de la bactérie recherchée tout en limitant au maximum le développement de la flore annexe, mais aussi de permettre à la bactérie de « récupérer » d'éventuels stress et/ou dommages ayant été occasionnés par le processus de fabrication de l'aliment. Cette phase d'enrichissement a pour principal objectif d'éviter les faux résultats négatifs.

Le choix des bouillons d'enrichissement et les températures d'incubation apparaissent donc comme déterminants. A l'heure actuelle trois milieux d'enrichissement sont plus largement utilisés pour la détection des *E. coli* O157:H7 : le Trypticase Soya Broth modified (mTSB), le milieu *E. coli* ainsi que l'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) (Vimont *et al.*, 2006). De plus, afin de limiter au maximum les effets de compétition bactérienne, les enrichissements peuvent être optimisés en ajoutant des substances favorisant la croissance des bactéries recherchées ou inhibant la croissance de la microflore annexe. 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 (Vimont *et al.*, 2006). De plus, des composants tels que l'acriflavine peuvent également être utilisés (Miszczycha *et al.*, 2012 – ANNEXE 10 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 1997). Cet intercalant est essentiellement rajouté dans les enrichissements de produits laitiers : l'acriflavine inhibe le développement des bactéries lactiques au profit des STEC (Weaver *et al.*, 1996).

La température d'incubation joue un rôle important lors de l'étape d'enrichissement. Pour *E. coli* O157:H7, il a été démontré qu'un enrichissement à 41.5 °C favorise son développement et ralentit la croissance des autres bactéries présentes dans la matrice alimentaire. Il est important de souligner que, par manque de données dans la littérature, les enrichissements des STEC non-O157 se font par défaut à 37 °C.

La durée d'incubation peut également jouer un rôle important. En fonction du milieu d'enrichissement choisi, la flore microbienne annexe se développe plus ou moins et peut avoir un impact sur la croissance de la bactérie cible. Ceci s'explique par un phénomène de compétition correspondant à l'épuisement d'une ressource limitante commune aux flores

microbiennes. Ce « ralentissement » simultané des microflores au début de la phase stationnaire de la microflore majoritaire est désigné sous le terme « d'effet Jameson ». Notons qu'il n'existe pas à l'heure actuelle, de milieux d'enrichissement spécifiques et recommandés pour les sérogroupes autres qu'O157 même si diverses études se sont intéressées à ce sujet (Possé *et al.*, 2008 ; Savoye *et al.*, 2011 ; Vimont *et al.*, 2006).

Il est important de rappeler que les bouillons d'enrichissement cités précédemment ont été mis au point pour les matrices carnées. Or, les matrices à base de lait cru sont riches en acide gras et présentent une communauté microbienne aussi importante que variée. Il a été observé notamment qu'une même souche de *E. coli* O157:H7 artificiellement inoculée dans une portion de viande hachée ainsi que dans une portion de fromage au lait cru de type pâte molle réagit différemment à l'étape d'enrichissement. Il s'avère nettement plus difficile de détecter et isoler cette souche pour l'essai avec le fromage que pour celui avec la viande (Miszczycha *et al.*, 2012 – ANNEXE 10). L'optimisation des méthodes d'enrichissement pour les produits à base de lait cru représente un challenge toujours d'actualité.

Pour conclure, rappelons que cette étape particulièrement délicate reste un équilibre à trouver entre l'inhibition de la croissance des autres micro-organismes et le développement optimum de la bactérie recherchée.

5.2. Détection des STEC

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses méthodes destinées à détecter les STEC à partir de matrices plus ou moins complexes. Ces méthodes reposent sur des techniques dites immunologiques (méthode ELISA...), phénotypique (isolement sur géloses spécifiques) ou génétiques basées sur l'amplification des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN (PCR, RT-PCR...). Nous nous intéresserons essentiellement aux méthodes basées sur la PCR car celles-ci, du fait de leur rapidité, efficacité et sensibilité, se sont imposées au sein des laboratoires d'analyses et de recherches pour la détection des STEC.

5.2.a. Principe de la PCR en temps réel (RT-PCR) – chimie TaqMan

Au cours de ces 10 dernières années, les progrès en matière de RT-PCR ont été nombreux et cette technique s'est depuis largement démocratisée et imposée au sein des laboratoires afin de détecter et confirmer la présence des gènes de virulence et des sérotypes de STEC directement à partir des bouillons d'enrichissement ou à partir de souches isolées après une étape d'extraction et purification de l'ADN. De nombreux protocoles ont été publiés afin de détecter les principaux gènes de virulence des STEC tels que les gènes *stx* ou *eae* ou encore les gènes *nle* (Bugarel *et al.*, 2010b ; Nielsen & Andersen, 2003 ; Perelle *et al.*, 2004), ou permettant d'identifier les différents sérogroupes/sérotypes (Lin *et al.*, 2011 ; Madic *et al.*, 2011 ; Mischczycha *et al.*, 2012 – ANNEXE 10 ; Perelle *et al.*, 2004 ; Perelle *et al.*, 2005). Ces protocoles reposent sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse appelées sondes « Taqman ». Ces sondes sont spécifiques de la partie du génome à amplifier, et sont composées d'un reporter (émetteur) qui émet de la fluorescence et d'un quencher (extincteur) qui l'absorbe. Lorsque la sonde est intacte (reporter et quencher à coté), le quencher absorbe la fluorescence émise par le reporter. Dans ce cas, il n'y a pas d'émission de fluorescence. A chacun des cycles de PCR, au cours de l'élongation du brin d'ADN, la *Taq*-polymérase hydrolyse la sonde grâce à son activité 5' exonucléasique. Le reporter est alors séparé du quencher et émet de la fluorescence. Cette fluorescence est alors détectée et enregistrée par l'automate et ce en temps réel. La positivité d'une PCR en temps réel est déterminée par le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié mais aussi de l'efficacité de la PCR. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

5.2.b. Limites de la RT-PCR

Les méthodes PCR destinées à détecter les STEC dans des matrices complexes comme les aliments présentent aussi certains inconvénients. Tout d'abord l'exploitation des Ct tardifs (entre le 38 et le 40^{ème} cycle pour des PCR de 40 cycles) est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur (Mackay, 2007). En effet, malgré l'enrichissement, la concentration des

STEC peut être faible et la complexité des matrices peut être un obstacle à l'extraction des acides nucléiques ainsi qu'au bon déroulement de la réaction de PCR. Par conséquent, il est fréquent d'obtenir des résultats avec un Ct tardif qu'il est alors difficile d'interpréter (faux positif ? détérioration de la sonde ? ...). De plus, cette technique est incapable de distinguer l'ADN des bactéries cibles de l'ADN libre, de cellules mortes ou provenant de phages. Les marqueurs détectés dans les aliments ne sont pas nécessairement présents sur la même souche et peuvent être situés sur différentes souches non pathogènes. Ainsi, une étape d'isolement est nécessaire pour récupérer la souche à l'origine des signaux PCR.

5.3. L'étape de confirmation

L'ensemble des tests cités précédemment permet seulement d'obtenir un résultat présomptif sur la présence de STEC. Il est donc toujours obligatoire de réaliser une confirmation de ce résultat. Cette étape nécessite l'isolement et l'identification de la bactérie cible recherchée (séro groupe, flagelles, présence des facteurs de virulence...).

Pour les souches *E. coli* O157, il existe plusieurs méthodes d'isolement validées: l'Immuno Séparation Magnétique (IMS), l'isolement direct et le VIDAS ICE. Pour les STEC appartenant aux sérogroupes O26, O103, O111 et O145, seule l'IMS existe. De plus, un étalement direct sur gélose sélective peut être réalisé.

L'IMS permet de rechercher et d'isoler les *E. coli* appartenant aux 5 sérogroupes (reconnus pathogènes par l'AFSSA (AFSSA, 2010)) présents dans le bouillon d'enrichissement.

5.4. Les différents milieux d'isolement

5.4.a. Isolement des *E. coli*

Il existe une grande diversité de milieux, certains sont spécifiques d'une espèce (*E. coli*) comme le milieu Coli ID (bioMérieux) et le milieu Rapid'*E.coli*2 (Bio-RAD). Ces milieux sont des milieux chromogènes permettant le dénombrement des coliformes et d'*E. coli*. Ils contiennent deux substrats chromogènes. Les coliformes autres qu'*E. coli* apparaissent sous forme de colonies bleues, grâce à la mise en évidence de la β -galactosidase; les colonies d'*E.*

coli apparaissent violettes/roses grâce à la mise en évidence de la β -glucuronidase. Les géloses sont incubées 18/24 heures à 37°C. Ces milieux sont utilisés dans la norme ISO 16654.

5.4.b. Isolement des *E. coli* O157:H7

Avant de décrire les différentes géloses spécifiques à ce sérotype, il est important de rappeler que la plupart des souches d'*E. coli* O157:H7 ont la particularité de ne pas fermenter le sorbitol et de présenter une activité β -glucuronidase négative (Cebula *et al.*, 1995 ; Monday *et al.*, 2001). La plupart de ces géloses reposent sur ces 2 caractéristiques.

Parmi ces milieux sélectifs, nous pouvons citer :

- le milieu MacCONKEY Sorbitol (CT-SMAC) (*E. coli* O157:H7 forme des colonies lisses, incolores, pouvant présenter un halo orangé d'alcalinisation).
- le milieu ChromID O157:H7 commercialisé par la société BioMérieux (après incubation, les colonies caractéristiques de *E. coli* O157:H7 ont une coloration verte à verte-bleue),
- le milieu BBL CHROMagar O157 commercialisé par la société Becton Dickinson (les colonies d'*E. coli* O157:H7 produisent un colorant de couleur mauve),
- la gélose RAPID'*E. coli* O157:H7 commercialisée par la société Bio Rad (les colonies d'*E. coli* O157:H7 apparaissent bleues sombres/noires).

Néanmoins, certaines souches d'*E. coli* O157:H7 sont capables de fermenter le sorbitol et présentent une activité β -glucuronidase positive (Monday *et al.*, 2001). Il est donc nécessaire d'être prudent lors de l'utilisation de ces géloses et notamment lors de la lecture de celles-ci.

5.4.c. Isolement des STEC non-O157:H7

En ce qui concerne la recherche des autres souches de STEC, l'identification sur gélose est beaucoup plus fastidieuse. En effet, les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes rendant possibles l'utilisation de milieux d'isolements particuliers. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose « entérohémolysine ». La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des

érythrocytes de moutons lavés, additionnés d'ions Ca²⁺ (Beutin *et al.*, 1989). Mais certains STEC non-O157 et STEC O157 fermentant le sorbitol, peuvent ne pas produire l'entérohémolysine et ne sont donc pas détectés sur gélose au sang (Bielaszewska *et al.*, 1998). Enfin, la présence d'un grand nombre de souches non-STECS produisant une hémolysine peut gêner le repérage des colonies suspectes sur gélose au sang.

Possé *et al.* (2008) ont mis au point un protocole permettant d'isoler et de détecter les quatre autres sérogroupes (O26, O103, O111, O145). Après un enrichissement approprié, les colonies sont isolées sur des géloses contenant entre autre des antibiotiques et un substrat (X-gal). Ces différents composants permettent de différencier phénotypiquement les STECS non-O157.

Une gélose commercialisée, la gélose CHROMagar STEC permet l'isolement des souches STEC : les *E. coli* O157 y apparaissent mauves, les *E. coli* O26 y apparaissent mauves et sont fluorescentes, les autres STECS y apparaissent mauves et sont plus ou moins fluorescents. Néanmoins, certains STECS non-O26 et non-O157 peuvent avoir des difficultés pour pousser sur cette gélose et certaines colonies non-STECS peuvent présenter les mêmes caractéristiques que les colonies STECS. Une autre gélose, la gélose Rainbow O157 agar permet de mettre en évidence les différents sérogroupes de STEC : O157 en noir/gris, O26 en violet, O103 en gris/violet/bleu-violet, O111 en gris-bleu/gris, O145 en gris-violet/bleu-violet, mais aussi les sérogroupes O45 en gris-violet/violet/magenta et O121 en magenta/violet.

5.5. Confirmation du sérotype et des facteurs de virulence de la souche

Une fois qu'une souche a été isolée, il est encore nécessaire de confirmer le sérotype (antigène somatique de surface O et antigène flagellaire H) et de rechercher les facteurs de virulence de la bactérie. En effet, rappelons que selon la définition de l'AFSSA (AFSSA, 2010) une souche STEC est dite pathogène si elle appartient à un des cinq sérotypes (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7) et qu'elle possède les facteurs de virulence *eae* et *stx*. Cette étape de confirmation est réalisée par PCR.

Points clefs

- ➔ Les STEC sont des *E. coli* caractérisés par la présence de gènes *stx* porté un phage de type lambdaïd.
- ➔ Les STEC pathogènes peuvent posséder d'autres facteurs de virulence tels que les gènes *eae* ou *saa* permettant à ces bactéries d'adhérer aux entérocytes.
- ➔ La Shiga-toxine codée par le gène *stx* est responsable des syndromes les plus graves provoqués par ces bactéries.
- ➔ Certaines souches de STEC sont responsables de diarrhées sanglantes pouvant évoluer en Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU). Ces bactéries sont à l'origine d'épidémies parfois de grande ampleur et sont appelées EHEC. Tous les EHEC sont des STEC, mais tous les STEC ne sont pas des EHEC.
- ➔ Les ruminants et plus particulièrement les bovins sont les principaux réservoirs de STEC. Ces bactéries sont excrétées dans leurs fèces et peuvent alors contaminer les aliments ou être disséminées dans l'environnement.
- ➔ Les STEC ont été responsables de nombreuses épidémies depuis les années 1980, impliquant des aliments très variés (viandes, produits laitiers, eau, végétaux).
- ➔ Jusqu'à présent le sérotype O157:H7 était le plus impliqué dans les épidémies et le plus recherché, mais les récentes avancées en matière de détection et certaines épidémies récentes tendent à démontrer l'implication de nombreux autres sérotypes de EHEC.

- ➔ Les techniques de détection sont de plus en plus performantes, mais les techniques d'isolement des souches ne sont malheureusement pas aussi efficaces. De plus, le choix de ne rechercher que certains sérotypes de STEC présente le risque d'exclure des analyses certains sérotypes extrêmement pathogènes bien que sporadiques.

- ➔ Une nouvelle spécification technique a été adoptée afin d'uniformiser au niveau européen la recherche des STEC.

CHAPITRE 2. STEC et produits laitiers

Les sources de contamination du lait, la prévalence des STEC dans les produits laitiers et les principales épidémies dues aux STEC impliquant des produits laitiers seront décrites dans ce chapitre. Les moyens de préventions seront ensuite abordés. Pour finir, l'impact des paramètres technologiques de la fabrication des fromages sur le devenir des STEC sera décrit.

Comme cela a été précisé dans le chapitre 1, les ruminants sont le principal réservoir des STEC (Gyles, 2007). Or, la contamination des produits laitiers par les STEC au niveau des fromageries, qui résulte généralement du non-respect des règles d'hygiène, est relativement rare. La contamination du lait se produit généralement en amont, au niveau des exploitations laitières (Ansay & Kaspar, 1997 ; Kousta *et al.*, 2010). Dans leur revue bibliographique, Hussein & Sakuma (2005a) ont observé que de nombreux sérotypes de STEC isolés dans différentes exploitations laitières du monde entier font partis des sérotypes ayant été à l'origine de pathologies chez l'être humain.

1. Excrétions des STEC par les ruminants laitiers

Les ruminants laitiers représentent un important réservoir de STEC et excrètent ces bactéries dans leurs fèces. Plusieurs études se sont intéressées à la prévalence du gène *stx* dans les fèces de ces ruminants sans procéder à l'isolement des souches (Gyles, 2007 ; Hussein & Sakuma, 2005a). Ces données doivent donc être interprétées avec prudence car elles ne témoignent pas de la réelle prévalence de souches STEC potentiellement pathogènes dans la matrice étudiée. En effet, les gènes *stx* ainsi détectés peuvent provenir de phages ou de souches *E. coli* n'appartenant pas aux sérotypes les plus fréquemment associés à des cas de

pathologies chez l'homme. Enfin, les gènes détectés peuvent être portés par l'ADN de cellules mortes.

Certains travaux ont estimé une prévalence de *E. coli* O157:H7 comprise entre 3 et 8% dans les troupeaux étudiés et une prévalence à l'échelle des animaux de 0,5 à 1% (Meyer-Broseta *et al.*, 2001). En 2009, une étude menée par l'EFSA et réalisée sur les fèces de plus de 5000 animaux, a révélé une prévalence des STEC atteignant 2,2%. En ce qui concerne le sérotype O157:H7, 0,5% des échantillons ont été testés positifs. En Belgique, une étude réalisée par Cobbaut *et al.* (2009) a rapporté la présence de souches *E. coli* O157 dans 37,8% des 180 fermes étudiées.

De manière générale, il faut garder en mémoire que les STEC peuvent être présents, même occasionnellement, dans la plupart des fermes (Hancock *et al.*, 2001).

Chez les brebis et les chèvres, la prévalence des STEC semble importante. Zschöck *et al.* (2000) ont ainsi mis en évidence la présence de STEC chez 32,1% des brebis et 75,3% des chèvres issues de 9 exploitations laitières étudiées en Allemagne. Dans ce même pays, Beutin *et al.* (1993) ont isolé des STEC chez 66,67% de 120 moutons et 56,1% de 66 chèvres. En Espagne, une première étude a révélé la présence de STEC chez 47,7% des chèvres issues de 12 troupeaux différents (Cortés *et al.*, 2005). Une autre étude a, quant à elle, relaté que sur 1300 brebis issues de 93 cheptels différents, 36% d'entre elles étaient porteuses de STEC (Blanco *et al.*, 2003). De plus, il semble que les sérotypes isolés chez ces animaux diffèrent de ceux habituellement isolés chez les bovins. Peu de souches appartenant au sérotype O157 ont en effet pu être isolées chez les ovins et les caprins (La Ragione *et al.*, 2009). De plus, malgré l'appartenance à certains sérotypes associés à des pathologies chez l'homme, les souches isolées possédaient rarement les gènes de virulences *stx2* et *eae* (Beutin *et al.*, 1993 ; Blanco *et al.*, 2003 ; Cookson *et al.*, 2006 ; Kudva *et al.*, 1996 ; Kudva *et al.*, 1997 ; Orden *et al.*, 2003 ; Solecki *et al.*, 2009 ; Zschöck *et al.*, 2000).

L'excrétion des STEC par les ruminants apparaît comme un évènement aléatoire. En effet, certains auteurs le décrivent comme étant sporadique (Heuvelink *et al.*, 1998 ; Mechie *et al.*, 1997 ; Rahn *et al.*, 1997). Kudva *et al.* (1997) ont d'ailleurs démontré que les moutons pouvaient excréter de manière transitoire des STEC. Or, Orden *et al.* (2008) ont démontré que des chèvres pouvaient excréter de façon persistante des STEC. L'analyse d'un seul

échantillon de fèces ne peut donc être suffisant pour déterminer si l'animal est excréteur ou non de STEC. Par ailleurs, les STEC peuvent persister plusieurs mois dans les fermes (Fremaux *et al.*, 2006 ; Geue *et al.*, 2009 ; Gyles, 2007 ; Hussein & Sakuma, 2005b ; Widiastih *et al.*, 2004). Liebana *et al.* (2005) ont pu démontrer que des souches d'*E. coli* O157 peuvent persister 17 mois dans une même ferme et être excrétées 7 mois par des vaches. L'excrétion des STEC peut varier en fonction des saisons avec une augmentation durant les mois d'été (Berry & Wells, 2010 ; Hancock *et al.*, 1997 ; Heuvelink *et al.*, 1998 ; Van Donkersgoed *et al.*, 2001). Par ailleurs, certains bovins peuvent être considérés comme des « supers excréteurs » de *E. coli* O157:H7 (taux excrété > 10⁴ UFC par gramme de fèces) et potentiellement d'autres sérotypes (Chase-Topping *et al.*, 2008). D'autres facteurs peuvent également contribuer à l'excrétion des STEC comme l'âge (Hussein & Sakuma, 2005b), l'alimentation (Jacob *et al.*, 2009), l'habitat (Ellis-Iversen *et al.*, 2008 ; LeJeune & Wetzel, 2007 ; McGee *et al.*, 2004 ; Vosough Ahmadi *et al.*, 2007 ; Wood *et al.*, 2007), le stress (Rostagno, 2009), la taille du troupeau (Eriksson *et al.*, 2005), la santé de l'animal (Byrne *et al.*, 2003 ; Orden *et al.*, 2003), la localisation géographique (LeJeune *et al.*, 2006) et les antécédents de contamination par des STEC ou tout autre pathogène (La Ragione *et al.*, 2009 ; Naylor *et al.*, 2007). Pour finir, il est important de préciser que certains de ces animaux sont capables d'excréter une grande variété de souches différentes pourtant issues d'un même sérotype. Jacob *et al.* (2011) ont observé que plusieurs souches d'*E. coli* O157:H7 avec des profils en PFGE différents pouvaient être isolées dans un même échantillon de fèces (chez 26% des animaux testés). Ainsi, des souches de même sérotype mais présentant un pouvoir pathogène potentiellement différent pourraient se retrouver dans un même échantillon.

Même si la voie fécale, suite notamment à de mauvaises conditions d'hygiène, est la principale source de contamination du lait par les STEC (Hussein & Sakuma, 2005b), une autre voie de contamination, bien que controversée, peut être évoquée : il s'agit d'une source intra-mammaire (Lira *et al.*, 2004 ; Matthews *et al.*, 1997 ; Stephan & Kuhn, 1999). Cette excrétion pourrait être provoquée par une mammite qui est une inflammation de la mamelle d'origine infectieuse (des bactéries pénètrent dans le canal du trayon, pendant la lactation ou la période sèche). Deux formes de mammite sont distinguées : la forme sub-clinique et la forme clinique. La première ne présente pas de signes cliniques extérieurs, le

diagnostic étant possible uniquement par numération cellulaire dans le lait. La deuxième quant à elle présente des signes locaux sur le lait comme la présence de grumeaux, et/ou sur la mamelle (quartier chaud, dur, enflé, douloureux) et peut parfois entraîner des signes généraux sur l'animal comme de la fièvre. Cette pathologie peut être provoquée par différents pathogènes tels que *S. aureus* ou encore les entérobactéries. Certaines suspicions de mammites provoquées par des STEC ont fait l'objet de publications. Matthews *et al.* (1997) ont avancé la possibilité d'une invasion des cellules épithéliales de la mamelle par *E. coli* O157:H7 en cas de mammite (observation *in vitro*). En 1999, une étude réalisée en Suisse sur le lait de 145 vaches atteintes de mammites provoquées par *E. coli* a révélé que 2,8% de ces souches possédaient bien le gène *stx* (Stephan & Kuhn, 1999). Une autre étude portant sur 2144 échantillons de lait provenant de vaches atteintes de mammites a montré que 12% des 182 *E. coli* isolées de ces échantillons étaient des STEC (Lira *et al.*, 2004). A l'inverse, aucune des souches *E. coli* responsables de mammites isolées en France ne possédaient de gène *stx* (Raynaud *et al.*, 2005). Les STEC sont, comme nous l'avons vu précédemment, présents dans les fermes. Or, par contact (notamment avec les matières fécales sur le sol), ces bactéries peuvent facilement atteindre les pis des animaux. A ce jour, peu de connaissance des voies de colonisation et d'adhésion de ces bactéries au niveau du pis de l'animal existent et il s'avérera certainement nécessaire d'approfondir nos connaissances sur ce phénomène afin de mieux appréhender le rôle potentiel de la mammite dans la contamination du lait par les STEC.

2. Sources et circulation des STEC dans les fermes

Comme cela a été évoqué dans le paragraphe précédent, les ruminants excrètent les STEC via leurs fèces. Or, ce phénomène est à même de contaminer, en plus du lait, tout l'environnement de la ferme. De nouveaux animaux peuvent alors être contaminés par ces STEC que ce soit par contact direct avec les individus porteur de ces bactéries ou indirect via l'environnement (Jonsson *et al.*, 2001 ; McGee *et al.*, 2002 ; McGee *et al.*, 2004). Cette contamination est d'autant plus forte lorsque des individus « super excréteurs » de STEC

sont présents au sein de la ferme (Chase-Topping *et al.*, 2008). La persistance des STEC dans l'environnement s'explique notamment par les capacités de ces bactéries à survivre dans différents milieux qui deviennent à leur tour des sources secondaires de contamination.

2.1. Survie dans les fèces

Les contaminations fécales jouent un rôle primordial dans la transmission des STEC au sein des fermes. La durée de vie des STEC dans les fèces varie selon les études, mais elle est généralement d'environ 100 jours, que ce soit pour *E. coli* O157:H7 ou *E. coli* O26:H11 et O111 (Duffy, 2003 ; Fukushima *et al.*, 1999 ; Scott *et al.*, 2006). Frémaux *et al.* (2010) ont montré que des STEC pouvaient survivre jusqu'à 2 mois dans des fèces de bovins et que la dispersion des pathogènes était avérée jusqu'à 20 cm sous la surface des sols de pâturages alpins. L' a_w élevée serait l'un des facteurs essentiels de la survie des STEC dans les fèces de bovins. L' a_w est généralement liée à la température dans les fèces de bovins. Plus la température est basse, plus l' a_w reste élevée : au dessus de 22 °C, l' a_w des fèces en fin de stockage est inférieure à 0,5, alors qu'elle reste voisine de 0,98-0,99 pour un stockage à + 5 °C (Wang *et al.*, 1996).

De plus, de nombreuses études ont montré que les STEC peuvent survivre plusieurs semaines dans le lisier et le fumier de bovins expliquant ainsi la persistance des STEC (Himathongkham *et al.*, 1999 ; Kudva *et al.*, 1998 ; Nicholson *et al.*, 2005). Frémaux *et al.* (2007a) ont quant à eux démontré qu'un brassage de fumier, artificiellement inoculé par des STEC, pendant le stockage permettait de diminuer leur taux.

Néanmoins, le devenir des STEC dans les fèces d'espèces autres que bovines est peu connu.

2.2. Survie des STEC dans la ferme

L'environnement immédiat de la ferme peut aussi être un lieu de transmission des STEC. En effet, Cobbold et Desmarchelier (2002) ont observé qu'une grande proportion des échantillons environnementaux au sein des exploitations était contaminée par des STEC. Williams *et al.* (2005) ont également observé que les installations de la ferme (granges...)

fournissaient de nombreux refuges pour les STEC. Ces bactéries peuvent aussi transiter par l'eau de boisson (Kuhnert *et al.*, 2005). Les abreuvoirs d'eau destinés au bétail sont des sources potentielles de contamination des animaux par les STEC (Polifroni *et al.*, 2012) qui peuvent survivre plusieurs mois dans cet environnement, voire plus de 200 jours sous forme de biofilms (Faith *et al.*, 1996 ; Gautam *et al.*, 2011 ; Hancock *et al.*, 1998 ; Kuhnert *et al.*, 2005 ; Shere *et al.*, 1998). La salive pourrait également être un vecteur important de contamination (Cobbold & Desmarchelier, 2002).

De plus, le niveau de contamination de l'environnement de la ferme pourrait être lié à la prévalence de la contamination en STEC du troupeau (Wilson *et al.*, 1992) : plus la proportion des animaux porteurs sains dans le troupeau est importante, plus la contamination environnementale serait forte. La litière est l'échantillon le plus fréquemment retrouvé positif, l'urine bovine pourrait aussi servir de substrat pour la croissance des souches d'*E. coli* O157:H7 (Davis *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude menée en Suède dans un élevage bovin laitier a montré que chez les veaux porteurs et excréteurs d'*E. coli* O157:H7 au printemps, seuls ceux gardés à l'étable pendant l'été excrétaient encore la bactérie alors que ceux mis au pré n'en excrétaient plus (Jonsson *et al.*, 2001). Ceci peut s'expliquer par un phénomène de re-contamination des animaux par l'intermédiaire de l'environnement de l'élevage (locaux, matériel...). Par ailleurs, d'autres animaux au sein de la ferme peuvent être des vecteurs de transmission de STEC tels que les porcs, les chats, les chiens ou encore les rongeurs et autres oiseaux (Berry & Wells, 2010 ; Beutin *et al.*, 1993 ; Blanco *et al.*, 2003 ; Eriksson *et al.*, 2005 ; Lahti *et al.*, 2003 ; Nielsen *et al.*, 2004 ; Synge *et al.*, 2003). Bien évidemment, le manque d'hygiène est l'une des principales causes de transmission des STEC au sein de la ferme.

2.3. Survie des STEC dans l'alimentation des ruminants

Une autre voie de transmission des STEC est l'alimentation. Certains auteurs ont montré que *E. coli* O157 étaient retrouvés relativement fréquemment dans les mangeoires (1,8%) (Hancock *et al.*, 2001). La présence du gène *stx* ainsi que la présence de souches STEC dans les bacs à nourritures ont aussi été rapportées (Polifroni *et al.*, 2012). De plus, *E. coli* O157:H7 pourrait également se reproduire dans une grande variété d'aliments pour bétail

(Lynn *et al.*, 1998). Des souches de STEC O157 ont pu survivre 60 jours dans le fourrage d'herbe (Davis *et al.*, 2005). Néanmoins, le comportement des STEC dans les ensilages est à ce jour peu documenté. Les ensilages peuvent être contaminés par des STEC *via* l'eau d'irrigation, le fumier ou la terre (Weinberg *et al.*, 2004). De plus, des souches d'*E. coli* ont pu être détectées en grand nombre dans des ensilages en décomposition, notamment dans les zones périphériques sujettes à une détérioration aérobie (Chen *et al.*, 2005). La mauvaise gestion des fermentations dans l'ensilage a été identifiée comme étant un facteur de survie d'*E. coli* O157 (Fenlon & Wilson, 2000). Lors de la mise en silo, une anaérobiose insuffisante peut retarder l'établissement de la fermentation lactique et entraîner une diminution du pH plus lente, augmentant ainsi la survie des *E. coli* pathogènes (Chen *et al.*, 2005). A l'inverse, une bonne gestion de la fermentation dans l'ensilage de maïs permettait de détruire efficacement des souches d'*E. coli* O26 inoculé artificiellement dans celui-ci avant sa mise en silo (Dunière *et al.*, 2011).

Cependant, à l'ouverture des silos, l'air qui pénètre dans l'ensilage induit une augmentation importante du pH autorisant la survie des STEC. En effet, une étude en 2011 a permis de mettre en évidence que des souches d'*E. coli* O26 contaminées artificiellement à l'ouverture des silos d'ensilage, pourraient survivre et se développer à la reprise de l'aération (Dunière *et al.*, 2011).

2.4. Survie des STEC dans les nappes phréatiques et le sol

Les eaux d'arrosage des végétaux pourraient également être contaminées par des déjections animales et la présence d'*E. coli* à de faibles taux dans des champs arrosés avec de l'eau d'irrigation souillée ou non-traitée a été observée (Weinberg *et al.*, 2004). *E. coli* O157:H7 peut, par l'intermédiaire des eaux de lessivage, contaminer le sol mais aussi les eaux peu profondes des nappes phréatiques (Gagliardi & Karns, 2000). Des souches de STEC de sérotype O26 ont pu être retrouvées jusqu'à 3 mois après leur inoculation dans des bouses (Fremaux *et al.*, 2007b). Les STEC peuvent survivre plus de 213 jours dans un sol sableux-limoneux inoculé à 10^6 UFC/g et recevant des déjections animales (Islam *et al.*, 2004). Il a été montré que des souches STEC pouvaient persister de 200 à 365 jours dans le sol (Fremaux *et al.*, 2008b ; Jiang *et al.*, 2002). Ainsi, la survie d'*E. coli* O157, ainsi que

d'autres sérotypes de STEC, dans des sols fertilisés par du fumier ou du lisier représente un risque non-négligeable de contamination des animaux, des végétaux ou encore de l'homme (Franz *et al.*, 2011).

3. Prévalence des STEC dans les produits laitiers

De nombreuses études se sont intéressées à la présence des STEC dans les produits laitiers (Baylis, 2009).

Néanmoins, il est important de garder un regard critique à propos des travaux concernant la prévalence des STEC dans ces produits ainsi que dans l'environnement de la ferme. En effet, depuis ces dernières années, l'essor de nouveaux protocoles de biologie moléculaire, essentiellement pour la PCR en temps réel, ont permis d'améliorer grandement la détection des gènes de virulence tels que *stx* ou *eae*. Mais ces techniques ne doivent pas faire oublier que la détection d'un marqueur de virulence n'implique pas nécessairement la présence dans le produit testé d'une souche de STEC viable : elles permettent d'acquérir des données quant à la prévalence de ces gènes et les caractéristiques des STEC dans les aliments testés (Beutin *et al.*, 2007b ; Fach *et al.*, 2001). C'est pourquoi l'étape de confirmation par isolation de la souche après la détection de gènes de virulence par PCR reste une étape cruciale. Il est important de ne pas faire l'amalgame entre prévalence de gènes de virulence dans une matrice et présence de souches possédant ces gènes (le gène *stx* peut très bien être porté par un phage libre). De plus, les méthodes usitées dans la plupart des études cherchant à caractériser la présence des STEC, notamment dans les produits laitiers, ne sont pas toujours comparables.

3.1. Prévalence des STEC dans le lait cru

L'importance dans le lait cru d'*E. coli* O157:H7 et des autres *E. coli* pathogènes a fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques dont notamment celles rédigées par Bastain & Sivelä (2000) et Hussein & Sakamura (2005a). La présence des STEC dans le lait cru est comprise

entre 0 et 2%. Les résultats sur la présence des STEC et la prévalence des gènes *stx* dans le lait cru sont présentés dans l'annexe 1. Des études récentes ont aussi démontré une forte prévalence des gènes *stx* sur les filtres de lait (Van Kessel *et al.*, 2011).

Néanmoins, depuis les années 2000, l'uniformisation de ces données est assez difficile. Ceci est la conséquence, entre autre, de l'évolution des méthodes de détection. De plus, les échantillonnages varient considérablement d'une étude à l'autre. Ces résultats témoignent d'une variabilité géographique des sérogroupes présents, mais aussi des réservoirs animaux (ovins ou caprins dans certaines zones). Les données obtenues montrent que la prévalence des gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* est généralement bien plus importante que celle des souches STEC isolées. A titre d'exemple, des études irlandaises et américaines ont déterminé une prévalence de ces gènes de virulence dans le lait cru de 36% et 21% alors que la présence de souches STEC n'était, respectivement, que de 0,8% et 3,2% (Cobbold *et al.*, 2008 ; Lynch *et al.*, 2012).

Deux facteurs peuvent expliquer cette différence. Tout d'abord la présence de certains gènes de virulence, comme par exemple le gène *stx*, n'implique pas forcément la présence de STEC, mais peut résulter de la présence de phages Stx. L'ADN détecté peut aussi être de l'ADN de cellules mortes ou de cellules viables mais non-cultivables. L'autre facteur concerne les méthodes usitées : les méthodes de détection génomiques sont bien plus sensibles que les méthodes d'isolement des souches (Miszczycha *et al.*, 2012 – ANNEXE 10).

3.2. Prévalence des STEC dans les fromages et autres produits laitiers

Une sélection de travaux récents sur la présence des STEC dans les produits laitiers autres que le lait est présentée dans l'annexe 2. La plupart de ces études concernent la recherche de STEC dans le fromage au lait cru/non-pasteurisé et reposent sur un nombre d'échantillons relativement restreint (très souvent moins de 100). La plupart des études concernant la recherche de gène *stx* dans les fromages sont européennes (Coia, 2001 ; Conedera *et al.*, 2004 ; Madic *et al.*, 2011 ; Pradel *et al.*, 2000 ; Rey *et al.*, 2006 ; Stephan *et al.*, 2008 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2005a ; Zweifel *et al.*, 2010).

En France, trois plans de surveillance concernant la contamination par des *E. coli* STEC des fromages au lait cru au stade de la production ont été réalisés. Les deux premiers ont été effectués en 2005 et 2007 où pour, respectivement, 871 et 392 échantillons de fromages analysés, aucun STEC n'avait été isolé. Le dernier plan de surveillance était prévu par la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8346 du 23 décembre 2008. Il a été réalisé tout au long de l'année 2009. Ce plan de surveillance a porté sur l'étude de 1924 échantillons de fromages fabriqués à partir de laits crus de vache, de brebis ou de chèvre. Un total de 17 souches de STEC a pu être isolé à partir de ces échantillons, soit une prévalence de 0,9%.

L'écart entre les résultats du plan de surveillance de 2009 et de ceux de 2005 et 2007 peut s'expliquer à la fois par le nombre d'échantillons analysés, mais aussi par la mise au point de protocoles de détection et d'isolement des souches toujours plus performants.

Au cours du plan de surveillance de 2009, 27,8% des échantillons ont été testés positifs pour le gène *stx* par analyse PCR mais seulement 8,1% des échantillons analysés ont été testés positif par PCR à la fois pour les gènes *stx* et *eae*.

Parmi les échantillons *eae+* et *stx+*, la présence d'au moins l'un des 5 principaux sérogroupes associés aux souches EHEC a été détectée pour 4,6% des échantillons analysés.

Les sérogroupes détectés par PCR correspondaient aux sérogroupes O26 (55 échantillons), O103 (41 échantillons), O145 (13 échantillons) et au séro groupe O157 (10 échantillons). Aucun échantillon n'avait donné de signal positif pour le séro groupe O111.

En termes de diversité des sérogroupes détectés au sein d'un même échantillon, 24 échantillons ont donné un signal positif pour plusieurs sérogroupes à la fois. Un seul des 5 sérogroupes recherchés a pu être identifié pour les 65 autres échantillons.

Au final, 40 échantillons ont permis l'isolement de souches (soit 45% des échantillons positifs présomptifs) : 17 (soit 0,9% - 17/1924- des échantillons analysés) se sont révélés contaminés par des souches STEC potentiellement pathogènes (*eae+* et *stx+*) ; 15 (soit 0,8% - 15/1924- des échantillons analysés) par des souches non-STECS mais possédant le gène *eae* et 8 (0,4% - 8/1924- des échantillons analysés) par des souches d'*E. coli* non-pathogènes ne possédant aucun des 2 facteurs de virulence.

La majorité des souches STEC isolées (13/17) possédait le gène *stx1* seul. Les 4 autres souches possédaient le gène *stx2* seul. Aucune souche isolée ne possédait à la fois les deux

gènes *stx1* et *stx2*. Cette dominance du gène *stx1* chez les souches STEC isolés de produits laitiers avait déjà été mise en évidence par Pradel *et al.* (2008).

La plupart des souches isolées (11/17) appartenait au sérotype O26:H11. Les 6 autres souches STEC isolées appartenait aux sérotypes O103:H2 (4 souches) ; O145:H28 (1 souche) et O157:H7 (1 souche).

Cette étude très complète de par le nombre important d'échantillons analysés et la méthodologie (de la recherche des gènes de virulence à l'isolement de souches viables) a apporté de nombreuses informations sur, d'une part, l'identification des sérotypes les plus présents dans ces fromages, mais aussi la présence importante du gène *stx1* en comparaison du gène *stx2* dans ces produits.

Tous ces travaux montrent que les STEC sont présents dans les produits laitiers au lait cru.

4. Epidémies liée à la présence de STEC dans les produits laitiers

Avant de décrire les différentes épidémies ayant impliqué la consommation de produits laitiers il est important de rappeler que toutes ces données sont difficilement comparables. Comme il a été précisé précédemment, les méthodes d'investigations au cours des années ont changé, les méthodes de détection se sont perfectionnées. De plus, la plupart des méthodes et investigations par le passé ne concernaient que le sérotype O157:H7, ce qui a pour conséquence d'avoir fortement biaisé les données relatives aux infections causées par les autres sérotypes de STEC.

Les données de l'EFSA (EFSA, 2011) indiquent, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, que les produits carnés et essentiellement la viande hachée, sont responsables de la majorité des épidémies impliquant les STEC. Néanmoins, le lait cru ainsi que ses produits dérivés sont eux aussi considérés comme des aliments à risque en Europe. Les principales épidémies dues aux STEC et ayant impliqué des produits laitiers sont répertoriées dans l'annexe 3.

La consommation de lait cru (vache ou chèvre) a été associée à plusieurs cas de pathologies en Europe et en Amérique du Nord. La plupart de ces épidémies ont été provoquées par des souches de sérotype O157:H7, mais d'autres souches de sérotypes, moins fréquents, ont eux aussi été pointés du doigt. Il s'agit des sérotypes O22 :H8, O110 :H-, O80 :H- ou encore une souche appartenant au sérogroupe O145. La consommation de fromage à base de lait cru de vache ou de chèvre a elle aussi été impliquée dans des cas épidémiques. Si le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment incriminé, d'autres souches telles que *E. coli* O27 :H20, O103, O26, O145, O27 :H20 ou encore O104 :H21 ont aussi été impliquées. Notamment, en France, fin 2005, 6 cas de SHU ont été recensés (InVS, 2007). L'enquête avait identifié un fromage de type pâte molle au lait cru et contaminé par le sérogroupe O26 comme à l'origine de l'épidémie.

L'implication moindre des sérogroupe non-O157 dans ces épidémies peut avoir pour origine, soit un manque d'investigation les concernant, soit une pathogénicité moindre par rapport à *E. coli* O157:H7.

Certaines épidémies ont également été associées à la consommation de produits laitiers, lait ou fromage pasteurisés (Nooitgedagt & Hartog, 1988 ; Upton & Coia, 1994). Des incidents lors de la pasteurisation ou des contaminations post-pasteurisation peuvent être responsables de ces contaminations. Des yaourts, des glaces fabriquées à la ferme et même des milk-shakes à base de lait pasteurisé ont eux aussi été impliqués dans des épidémies liées à des STEC (Becker, 2005 ; De Schrijver *et al.*, 2008 ; Morgan *et al.*, 1993). Des cas de SHU (5) ont été rapportés récemment suite à la consommation de glaces fabriquées dans une ferme laitière à base de lait pasteurisé (Buvens *et al.*, 2011). Des souches d'*E. coli* O145:H28 et O26:H11 ont été responsables de ces cas. D'après les investigations réalisées, une contamination post-pasteurisation serait responsable de la présence de ces STEC dans le produit.

En conclusion, les produits laitiers à base de lait cru mais aussi à base de lait pasteurisé ont été impliqués dans plusieurs épidémies suite à une contamination par des souches STEC. Néanmoins, ces épidémies ont toutes été de moindre importance que celles provoquées suite à l'ingestion de produits carnés, d'eau ou de végétaux (Beutin & Martin, 2012 ; Hrudefy *et al.*, 2003 ; Karmali *et al.*, 1983 ; Michino *et al.*, 1999).

5. Mesures de prévention des contaminations du lait et des produits laitiers

Afin de limiter les contaminations du lait par les STEC, diverses stratégies, seules ou combinées ont été et sont envisagées. Elles reposent essentiellement sur des pratiques d'hygiène, nutrition des animaux et l'information des consommateurs. Néanmoins, le manque de connaissances relatives à la diversité, à la résistance des différentes souches de STEC, aux taux d'excrétions fécales des STEC au sein des troupeaux ainsi qu'à l'intercontamination, compliquent les interventions (Fremaux *et al.*, 2007a ; Fremaux *et al.*, 2007b ; Fremaux *et al.*, 2008b ; Fremaux *et al.*, 2008a ; Matthews *et al.*, 2006 ; Son *et al.*, 2009).

5.1. Intervention en amont de la traite

Une bonne hygiène de la traite permet de limiter toute contamination fécale des trayons de l'animal et donc permet d'éviter une contamination du lait par des STEC. Néanmoins, il faut garder en mémoire que la flore naturelle située sur la peau des trayons joue un rôle pour les technologies fromagères et intervient dans la qualité organoleptique de certains fromages au lait cru. Une destruction non-maîtrisée de toutes les flores microbienne est à exclure. Le soin tout particulier porté à l'hygiène de tout l'équipement de la traite ainsi que les bonnes pratiques d'hygiène (fermes, cour, litière, mais aussi pour l'eau et la nourriture), le contrôle ainsi que le stockage et l'élimination correct des effluents sont une des clefs pour limiter la contamination du lait (Anonymous, 2004 ; Anonymous, 2007 ; Anonymous, 2008 ; Duffy, 2003 ; Hussein & Sakuma, 2005b ; LeJeune *et al.*, 2001 ; Raynaud *et al.*, 2005 ; Scott *et al.*, 2006). Malgré toutes ces précautions, d'autres mesures plus élargies peuvent aussi être prises :

- isoler les animaux à risques tels que les jeunes veaux qui excrètent une quantité d'*E. coli* plus importante que les adultes (Rugbjerg *et al.*, 2003) ainsi que des individus malades (diarrhées...). De plus, il est nécessaire de garder en quarantaine tout animal rejoignant le troupeau le temps d'effectuer des analyses. Il est aussi important de séparer toutes les espèces animales au sein de la ferme (ovins, bovins, caprins...), éviter le contact avec les animaux sauvages, désinsectiser et dératiser. Un soin tout particulier doit être porté à la détection des individus « super excréteurs » de STEC qui doivent être identifiés puis isolés en priorité dans la ferme afin de limiter le risque de propagation des STEC (Chase-Topping *et al.*, 2008).

- La mise au point de vaccins afin de prévenir la colonisation des pathogènes est une mesure actuellement testée aux USA. Elle a été particulièrement étudiée contre le sérotype O157:H7. Ces vaccins ciblent différents facteurs (intimine, LPS O157, récepteur à sidérophore) et ont pu démontrer une certaine efficacité en ce qui concerne la diminution de l'excrétion de STEC tant sur la quantité que sur la durée (Asper *et al.*, 2007 ; Bretschneider *et al.*, 2007 ; Callaway *et al.*, 2004 ; Cull *et al.*, 2012 ; Dziva *et al.*, 2007 ; Judge *et al.*, 2004 ; McNeilly *et al.*, 2008 ; McNeilly *et al.*, 2010 ; Peterson *et al.*, 2007a ; Peterson *et al.*, 2007b ; Sargeant *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008 ; Thomson *et al.*, 2009 ; Thornton *et al.*, 2009 ; Vilte *et al.*, 2011). Néanmoins, la vaccination n'empêche malheureusement pas la colonisation du tractus digestif des bovins (Dziva *et al.*, 2007) et la prévalence de STEC dans le troupeau n'en est pas diminuée (Van Donkersgoed *et al.*, 2001). De plus, la vaccination a surtout été testée dans des parcs d'engraissement et uniquement contre le sérotype O157. Tester cette technique au niveau des exploitations laitières où la prévalence des STEC peut être plus faible que dans les parcs d'engraissement et où les animaux sont nourris et traités différemment pourrait s'avérer utile. Il serait aussi important de mettre au point des vaccins ciblant d'autres sérotypes de STEC.

- L'ajout de probiotiques, antimicrobiens, sodium de chlorate ou encore de bactériophages dans l'alimentation a été testé (Sargeant *et al.*, 2007). Certains de ces traitements ont démontré une efficacité contre l'excrétion fécale d'*E. coli* O157, notamment la combinaison de *Lactobacillus acidophilus* et *Propionibacterium freudenreichii* et de sodium de chlorate ajoutée à l'alimentation ainsi qu'à l'eau. Une publication a cependant remis en cause l'effet réducteur de *Lactobacillus acidophilus* sur l'excrétion d'*E. coli* O157:H7 (Cull *et al.*, 2012). A

l'inverse, l'utilisation d'antimicrobiens dans l'alimentation et l'eau ne semble pas avoir d'impact sur l'excrétion des STEC (Callaway *et al.*, 2004 ; Callaway *et al.*, 2009 ; Khanna *et al.*, 2008 ; Loneragan & Brashears, 2005 ; Sargeant *et al.*, 2007). Par contre, l'utilisation d'une thérapie continue à l'aide de bactériophages semble donner des résultats intéressants, malgré la crainte de développement de résistance (Rozema *et al.*, 2009).

- Le type de nourriture semble avoir un impact direct sur l'excrétion d'*E. coli* O157:H7 (Callaway *et al.*, 2009): la population de *E. coli* est supérieure chez les animaux nourris au grain comparé à ceux nourris aux fourrages ; si le régime alimentaire de ces bovins est brutalement changé du grain au fourrage, les auteurs ont pu observer une diminution de la population de *E. coli* d'un facteur 1000 en 5 jours. Néanmoins, ces résultats ne sont pas toujours répétables et dépendent de nombreux facteurs comme la complexité de la flore intestinale, la façon dont les animaux sont nourris ou encore des variations de l'aliment lui-même (Jacob *et al.*, 2009).

Malgré toutes ces mesures, il paraît quasi impossible de parvenir à une éradication complète des STEC dans l'environnement de l'exploitation laitière du fait de leur prévalence élevée au sein des troupeaux (Collins & Wall, 2004 ; Hancock *et al.*, 2001).

5.2. Intervention en aval de la traite

Une fois le lait prélevé, le risque de contamination par les STEC persiste. Un niveau d'hygiène très élevé est évidemment obligatoire dès la traite finie ainsi qu'à l'endroit où le lait cru est stocké. Diverses mesures devraient être respectées comme la conservation du lait à moins de 12°C dans des réservoirs, l'utilisation de ce lait pour la fabrication du fromage moins de 18h après la traite, le nettoyage et la désinfection correcte des équipements utilisés. Idéalement, des contrôles microbiologiques sur l'ensemble de l'environnement de travail devraient être effectués, même si une telle mesure paraît peu réalisable. Des mesures complémentaires peuvent toutefois être usitées (Anonymous, 2004):

- le lait doit être analysé fréquemment,
- si du lait pasteurisé et non pasteurisé sont utilisés dans la même laiterie, ceux-ci doivent être triés et ne pas être mis en contact,

- seuls les laits provenant d'exploitations laitières où le lait est de bonne qualité doivent être utilisés.

Les productions de fromages au lait cru impliquent donc de gérer le risque de contamination dès la production de lait.

5.3. Risques de persistance des souches sous forme de biofilms

En ce qui concerne la fromagerie, les bonnes pratiques d'hygiène ainsi que les principes de HACCP doivent être respectés. Peu d'études se sont concentrées sur la formation de biofilms dans l'environnement laitier/fromager. Cependant, des données recueillies dans le domaine carné mais aussi clinique ont montré qu'*E. coli* O157:H7 est capable de former des biofilms et d'adhérer à des surfaces communément utilisées dans le domaine alimentaire comme l'acier inoxydable (Dewanti & Wong, 1995 ; Ryu & Beuchat, 2005). Néanmoins, cette capacité semble être dépendante de la souche. Des études ont montré que les souches ayant tendance à former des biofilms présentent une forte expression de *curli* et autres structures de type *fimbriae* (Cookson *et al.*, 2002 ; Ryu *et al.*, 2004). A titre d'exemple, des expériences réalisées avec des souches STEC de sérotype O174 :H21 et O91 :H21 ont démontré que la production de *curli* accroît fortement leur capacité à former des biofilms en comparaison avec des souches n'exprimant pas de *curli* (Rivas *et al.*, 2007). Les travaux de Wang *et al.* (2012) réalisés sur des souches de sérotype O157:H7, O26:H11 et O111:H8 ont aussi démontré que les STEC producteurs de *curli* pourrait générer des biofilms résistant aux agents de désinfection. La présence d'autres populations bactériennes sur une surface peut accroître la formation de biofilms de *E. coli* O157:H7 (Marouani-Gadri *et al.*, 2009) et une autre étude a mis en évidence qu'*E. coli* O157:H7 pouvait coloniser les biofilms d'autres bactéries (Uhlich *et al.*, 2010). Sous forme de biofilms, *E. coli* O157:H7 présente malheureusement une plus grande résistance aux désinfectants (Ryu & Beuchat, 2005 ; Uhlich *et al.*, 2010), même si une combinaison de nettoyant alcalin et de solution de nettoyage à base d'hypochlorite semble avoir un effet sur l'inactivation de ces biofilms (Sharma *et al.*, 2005). Toutefois, ces biofilms permettent à *E. coli* O157:H7 de résister à des

cycles de nettoyages/désinfections quotidiens, les rendant ainsi particulièrement persistants et capables de contaminer à nouveau d'autres aliments (Marouani-Gadri *et al.*, 2009).

Au niveau des chaînes de distributions ainsi que chez les consommateurs, là aussi, les mesures d'hygiène doivent être respectées.

Toutes les différentes pratiques décrites précédemment, seules, ne peuvent suffire à prévenir une contamination des produits laitiers par les STEC. Il est recommandé de combiner ces différentes mesures (Callaway *et al.*, 2009 ; Vosough Ahmadi *et al.*, 2007). L'efficacité de la combinaison de ces « effets barrières » a été démontrée par différents auteurs (Ellis-Iversen *et al.*, 2008 ; Vosough Ahmadi *et al.*, 2007 ; Wood *et al.*, 2007).

6. La technologie fromagère

Comme il a été décrit précédemment, les STEC peuvent contaminer les produits laitiers et notamment les fromages. La consommation de lait cru reste rare en Europe et sur le continent Nord Américain et elle a laissé place à la consommation de lait pasteurisé, solution efficace d'assainissement de ce type d'aliment. Mais il en est autrement du fromage. En effet, la production et la consommation de fromage au lait cru sont ancrées dans l'histoire et les traditions de chaque région et pays. De plus, l'utilisation de lait cru confère à cet aliment des qualités organoleptiques différentes de celles conférées par le lait pasteurisé. Or, au cours de la fabrication et de l'affinage, différents facteurs environnementaux et intrinsèques au fromage lui-même peuvent avoir un impact sur le développement des STEC. La stabilité microbienne des fromages résulte de la combinaison de différents facteurs qualifiés de « facteurs barrières » (ou « Hurdle factors » en anglais), tels que le pH, l' a_w , la teneur en sel ou même les ferments utilisés et la flore des laits crus, qui deviennent de plus en plus contraignants pour les STEC au cours de la fabrication du fromage (Leistner, 1995). Néanmoins, de nombreux travaux ont mis en évidence que les *E. coli* possèdent des mécanismes permettant de lutter contre ces différents stress. Il a été démontré l'existence de résistances croisées à plusieurs stress tels que l'acidité, la chaleur et le sel (Rowe & Kirk,

1999). D'autres auteurs ont également émis l'hypothèse qu'un effet synergique de ces « facteurs barrières » existe dans les fromages (Gálvez *et al.*, 2007). Le but de cette partie est de décrire rapidement les principales étapes de la fabrication d'un fromage puis d'évoquer les différents facteurs intrinsèques aux fromages et environnementaux pouvant impacter le devenir des STEC au cours de la fabrication des fromages. Il est aussi important de rappeler que la plupart des travaux, à ce jour, ont été effectués sur *E. coli* O157:H7 et que très peu de données existent pour le STEC non-O157.

6.1. Généralités sur la technologie fromagère

L'article 1^{er} du chapitre 1 du décret no 2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères dit que la dénomination « fromage » est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitières suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse.

6.1.a. Historique, type de fromages

Le lait, par ses grandes qualités nutritionnelles a toujours été considéré comme un aliment à part entière. Mais l'instabilité de ce produit qui freine sa conservation, tout comme l'irrégularité de la production laitière, ont forcé nos ancêtres à développer des techniques permettant une meilleure conservation du lait. Ils ont ainsi donné naissance aux premières technologies fromagères. Les fromages constituent donc une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et gustatives sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe.

Le fromage résulte de la concentration des éléments majeurs du lait (protéines, matière grasse) sous l'action de l'acidification et/ou d'une enzyme (le plus souvent, la présure extraite de la caillette des jeunes bovins avant sevrage ou la présure d'origine fongique).

6.1.b. Classification des fromages

La classification des fromages est relativement difficile et hétérogène. Certaines classifications notamment anglo-saxonnes se basent sur la dureté du fromage, on distingue alors les « soft cheeses » (Camembert, Brie...), les « semi-soft cheeses » (Mozzarella...), les « semi-hard cheeses » (Cantal, Emmental...) et les « hard cheeses » (Parmesan...). En France, une classification a été proposée par Lenoir *et al.* (1983). A partir de cette classification, 7 grandes catégories de technologie fromagère peuvent être définies (Mahaut *et al.*, 2000):

- Les fromages frais ou pâtes fraîches ;
- Les pâtes molles à croûtes fleurie et à croûte lavée ;
- Les pâtes persillées ;
- Les pâtes pressées non-cuites et cuites ;
- Les pâtes dures ;
- Les pâtes filées ;
- Les fromages fondus.

6.1.c. La fabrication du fromage

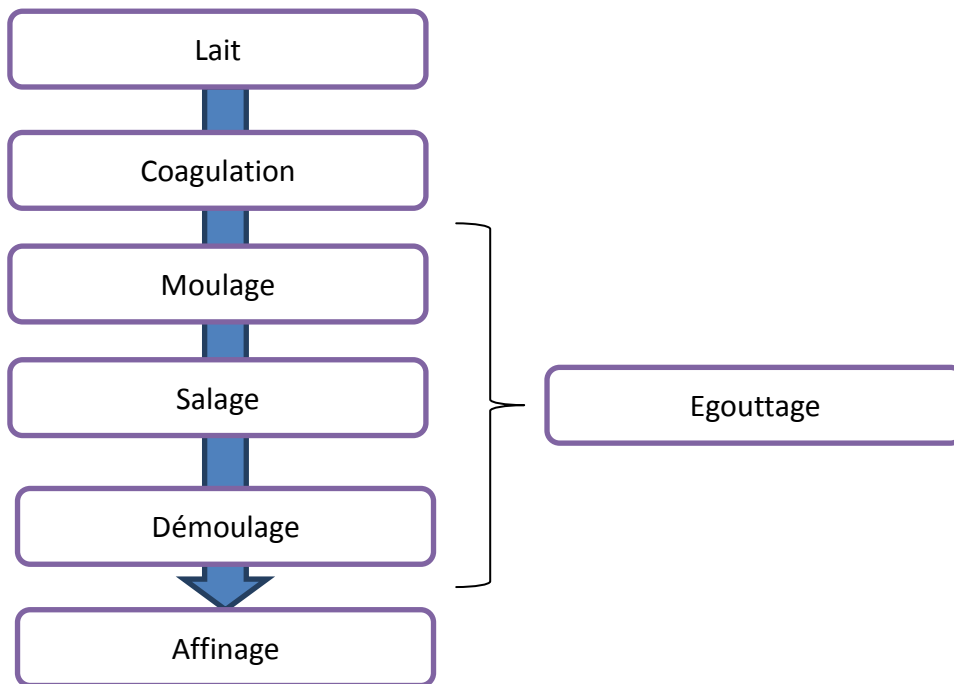
Il est important de rappeler qu'il existe autant de schémas technologiques de fromages qu'il existe de fromages différents et chaque fromager possède son propre savoir faire. Néanmoins, les différents points présentés ici, très généraux, permettent d'appréhender la complexité des étapes nécessaires à la transformation du lait en fromage.

La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales (Figure 14) (Mahaut *et al.*, 2000):

- la coagulation du lait,
- l'égouttage du caillé,
- l'affinage (qui peut-être très court).

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau.

Figure 14. Les grandes étapes de la fabrication fromagère.



Ces différentes étapes et leur impact sur le devenir des STEC seront décrites plus précisément au cours de cette partie.

6.1.d. La composition du lait

Le lait est composé principalement d'eau, environ 87 à 88 % tandis que la matière sèche est elle composée de matières grasses (3 à 4 %), de lactose (4,7 à 5,2 %) et de matières azotées (3,2 à 3,6 %). Il est important de préciser que tous les laits n'ont pas la même composition. En effet, à titre d'exemple, le lait de vache et de chèvre sont relativement similaires avec notamment 4,1 % de matières grasses tandis que le lait de brebis est différent et possède presque le double de matières grasses (avec un taux de matières sèches dépassant les 19 %). Ainsi, tous les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent des caractéristiques différentes, telle que la richesse et la composition en caséine, les équilibres salins, la teneur en lactose, ou encore la matière grasse.

La matière grasse du lait est essentiellement composée de triglycérides. Néanmoins, les proportions d'acides gras dépendent de l'alimentation et varient d'une espèce à l'autre. Au niveau des sucres, le lactose est le constituant le plus abondant du lait de vache. Il joue un rôle important, notamment de part sa valeur nutritionnelle et sa fermentescibilité qui

commande l'élaboration de divers produits laitiers. Des vitamines (A, B1, B2, B12 et acide folique) sont également présentes dans le lait ainsi que diverses enzymes (lipase, lactoperoxydase...). En ce qui concerne les matières azotées, la caséine représente presque 80% des protéines du lait de vache. Il existe différents types de caséine (α S1, α S2, β et κ). Ces molécules s'associent entre elles de façon à créer un édifice plus volumineux : la submicelle et les submicelles de caséine s'associent pour donner la micelle de caséine. Ces micelles de caséine sont des particules sphériques d'un diamètre de 30 à 300 nm. Les micelles de caséines sont des colloïdes hydrophiles qui doivent leur stabilité à deux facteurs: les caractéristiques physiques de la surface et le degré d'hydratation.

6.2. Principales étapes de la fabrication du fromage

La coagulation résulte de la modification de la micelle et/ou de l'environnement ayant des répercussions sur sa stabilité. L'acidification et/ou l'action protéolytique de certaines enzymes, ou encore les traitements thermiques peuvent être à l'origine de ce phénomène. Cette déstabilisation du système colloïdal est la base d'un ensemble de technologies particulièrement utilisées en fromagerie (Mahaut *et al.*, 2000).

Trois types de coagulation existent :

- La coagulation acide : elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i=4.6$) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique, par acidification chimique (injection de CO_2) ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide.
- La coagulation de type présure : elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes coagulantes. Les enzymes utilisées peuvent être d'origine animale (chymosine), mais aussi végétale ou microbienne.
- La coagulation mixte : elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification.

L'égouttage du coagulum consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique. Cette élimination du lactosérum est plus ou moins rapide selon la nature et l'histoire du coagulum.

Pour l'égouttage du coagulum acide, le gel présente une forte perméabilité qui conduit à un simple écoulement statique du sérum qui reste toutefois faible en raison du manque de contraction. En fin d'égouttage, le fromage est une pâte humide sans cohésion (78 à 80 % d'eau).

Pour l'égouttage du coagulum présure et mixte, ce gel présente une forte porosité, mais une perméabilité faible. Il est donc nécessaire pour rompre cet état de faire appel à un certain nombre de traitements mécaniques, physicochimiques et thermiques. Ces traitements sont d'autant plus intenses que l'extrait sec recherché dans le fromage est élevé. Les principaux sont :

- Le tranchage qui consiste à découper le gel en portion égales et plus ou moins grandes afin d'augmenter la surface d'exsudation du lactosérum.
- La brassage évite la soudure du grain de caillé en maintenant libres les surfaces d'échanges.
- Le chauffage permet un égouttage plus important du grain de caillé. Il diminue ainsi la viscosité du lactosérum et renforce les liaisons hydrophobes à l'intérieur du grain de caillé qui se contracte et expulse la phase aqueuse à l'extérieur du grain.
- Le pressage permet de donner sa forme définitive au fromage, d'évacuer le sérum et l'air et de favoriser la soudure des grains de caillé.
- Le salage a plusieurs objectifs : il assure un complément d'égouttage, peut contribuer à la formation de la croûte et module l'activité de l'eau (a_w) qui oriente et freine les développements microbiens et actions enzymatiques au cours de l'affinage et d'accroître le potentiel organoleptique du fromage.

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé. Ce substrat issu de la coagulation et de l'égouttage du lait est constitué de matière protéique, de matière grasse et d'une fraction des composants solubles du lait.

L'affinage est un processus biochimique complexe pour plusieurs raisons :

- la matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique,
- les enzymes intervenant dans l'affinage ont plusieurs origines. Elles peuvent être endogènes, apportées au lait ou elles peuvent surtout être produites par les micro-

organismes naturellement présents dans le lait ou ajoutées comme ferments ou encore par ensemencement naturel lors du saumurage.

Les transformations biochimiques en perpétuelle évolution dynamique modifient la pâte et la croûte des fromages pour lui conférer ses saveurs, arômes et textures caractéristiques. Les facteurs environnementaux auront un rôle déterminant sur la dynamique microbienne et la production d'enzymes et leur activité.

6.3. Facteurs intrinsèques ayant un impact sur les STEC au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage

6.3.a. Le pH

Au cours de la fabrication (sous l'action des bactéries lactiques), la production d'acide lactique entraîne une importante chute du pH, passant d'environ 6,8 (pH moyen du lait) à des valeurs proches de 4,5 (mais jamais inférieures à 4) pour certains types de fromages comme les pâtes lactiques (Tableau 6). *E. coli* O157:H7 se développe de manière optimale à des pH avoisinants 7. Des études ont néanmoins montré, *in vitro*, que certaines souches STEC sont capables de croître à des pH compris entre 4,5 et 9 (Dineen *et al.*, 1998 ; Glass *et al.*, 1992). Par ailleurs, certaines souches très acido-résistantes sont capables de résister à des pH voisins de 3 (Jordan *et al.*, 1999a).

Aux valeurs de pH rencontrées dans les fromages, se sont essentiellement les systèmes d'acido-résistance AR4 et AR5 qui permettent à la bactérie de lutter efficacement contre l'acidité rencontrée au cours de la fabrication du fromage (cf. chapitre 1).

Tableau 6. pH des gels en fonction du type de coagulation (Ramet, 1985).

Type de fromage	Pâtes fraîches	Pâtes molles	Pâtes pressées	Pâtes dures
pH d' emprésurage	6 à 6,7	6,45 à 6,5	6,55 à 6,7	6,60 à 6,75
pH fin d'égouttage	4,3 à 4,7	4,5 à 4,8	4,8 à 5,2	5 à 5,5

Par ailleurs, King *et al.* (2010b) ont pu mettre en évidence que la réponse induite lors du stress avec l'acide lactique et l'HCl est assez similaire, que ce soit pour la souche *E. coli* K12 ou pour la souche *E. coli* O157:H7. Leurs travaux ont également mis en évidence que plusieurs gènes (comme les gènes activés en cas de stress froid tels que *csdA* ou *cspA*), quel que soit l'acide utilisé, sont activés, indiquant une réponse « universelle ». De même, des gènes impliqués dans la réponse au stress froid sont eux aussi activés tout comme des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou codant pour des chaperonnes. Ils ont pu démontrer que la souche *E. coli* O157:H7 testée possédait une meilleure capacité de survie en condition acide associée à d'autres stress que la souche *E. coli* K12. Ils ont donc émis l'hypothèse que certaines souches de STEC pourraient posséder une meilleure résistance aux stress générés par les processus de fabrication agroalimentaire et l'environnement de l'hôte que les souches *E. coli* non-pathogènes

Il est important de mentionner que la plupart des expérimentations ayant permis la mise en évidence de ces mécanismes ont été réalisées *in vitro* avec l'utilisation d'acides forts comme l'HCl. Or, dans le fromage, l'acidité n'est pas la conséquence de l'action d'un acide fort, mais elle est due à l'action d'acides faibles comme l'acide lactique dont l'effet antimicrobien a déjà été mis en évidence (McWilliam Leitch & Stewart, 2002a ; McWilliam Leitch & Stewart, 2002b). D'autres études (Glass *et al.*, 1992) ont aussi mis en évidence, *in vitro*, qu'à pH équivalent, l'acide lactique présente un effet inhibiteur plus fort sur *E. coli* O157:H7 que le HCl. Au cours de l'étape de coagulation, les bactéries lactiques produisent des acides organiques qui ont pour effet d'entraîner une diminution du pH. Mais contrairement aux acides inorganiques qui acidifient directement le pH, les acides organiques sont eux capables de pénétrer dans la cellule sous leur forme protonée. La déprotonation de cet acide dans la cellule libère à la fois un proton et la forme anionique de l'acide. La cellule est alors confrontée à un afflux de protons qu'elle peut gérer à l'aide des systèmes de résistance à l'acidité, mais aussi à une accumulation de la forme anionique de l'acide qui peut perturber certaines voies métaboliques et provoquer des stress osmotiques (Roe *et al.*, 1998). L'action de ce type d'acide n'est pas encore totalement connu, et encore moins en ce qui concerne son action sur les STEC dans la matrice extrêmement complexe qu'est le fromage. Jordan *et al.* (Jordan *et al.*, 1999b) avaient démontré *in vitro* qu'un taux de 50mM de lactate pouvait, à pH 3, avoir un impact sur la survie de *E. coli* O157:H7, mais un pH si acide ne peut être

atteint au cours du processus fromager. De plus, certains auteurs n'ont pas observé d'effets inhibiteurs importants de l'acide lactique sur *E. coli* O157:H7 dans le lait (Farrag *et al.*, 1992) et le lait écrémé (Chang *et al.*, 2000). Une étude (Montet *et al.*, 2009) a même mis en évidence *in vivo* que des souches STEC acido-résistantes et acido-sensibles étaient capables de survivre à la fabrication d'un fromage de type pâte molle dont le pH pouvait atteindre 4,6. Toutes ces données semblent indiquer que le pH au cours des premières heures de la fabrication fromagère ne semble pas être un facteur capable d'assainir totalement le produit des STEC, mais qui peut néanmoins ralentir/inhiber la croissance de ceux-ci.

Au cours de l'affinage, le pH se comporte de manière différente en fonction du type de technologie fromagère. La consommation de l'acide lactique par certaines microflore comme les levures et les moisissures est responsable d'une augmentation du pH. Par exemple, pour les fromages de type pâte molle, l'acide lactique est rapidement consommé, entraînant une augmentation centripète du pH : celui-ci peut atteindre une valeur de 7 dans la croûte et une valeur de 6 dans la pâte (Lenoir, 1962). A l'inverse, pour les fromages à pâte pressée cuite, le pH reste généralement stable aux alentours de 5,5 (Berdague & Grappin, 1967). De telles valeurs de pH ne sont donc pas létales pour les STEC.

Enfin, la réponse au stress acide pourrait favoriser la survie des STEC en activant certains mécanismes de défenses contre d'autres stress.

6.3.b Le salage et l'activité de l'eau (a_w)

Le salage a plusieurs objectifs : il assure un complément d'égouttage, peut contribuer à la formation de la croûte et module l'activité de l'eau (a_w) qui oriente et freine les développements microbiens et actions enzymatiques au cours de l'affinage, et permet d'accroître le potentiel organoleptique du fromage. La plupart des fromages ont une teneur en sel inférieure à 4 % (Tableau 7). Quelques rares fromages présentent un taux de sel plus élevé (8 à 15 % de NaCl) (Mahaut *et al.*, 2000). Il est important de souligner que le salage peut être appliqué en surface, directement dans le caillé ou par immersion (saumurage). Ces différents modes entraînent une répartition différente du sel, qui tendra à diffuser, dans le cas du saumurage, lentement vers l'intérieur du fromage. Par conséquent, l' a_w est aussi relativement hétérogène entre le cœur du fromage et la croûte.

Glass *et al.* (1992) ont démontré que, *in vitro* dans du TSB, *E. coli* O157:H7 est inhibé à des concentrations de NaCl supérieures ou égales à 8,5%, mais que cet STEC peut tout de même continuer à croître en présence de 6,5 % de NaCl. Hormis pour ces cas très particuliers, la teneur en NaCl des fromages n'est pas suffisante pour être létale pour les STEC.

Tableau 7. Teneur en sel de quelques fromages (Mahaut *et al.*, 2000)

Type de fromage	Taux de NaCl (en %)
Emmental	0,5 à 0,7
Comté	0,8
Camembert	1,7 à 2,7
Cantal	2
Munster	2,4
Roquefort	4
Féta	8 à 15

Néanmoins, le salage a un impact sur l'activité de l'eau (a_w). L' a_w est un paramètre important de sélection microbienne et de l'action des enzymes. Certains micro-organismes sont aptes à se développer dans des milieux à faible a_w comme la plupart des levures et des *Penicillium* (jusqu'à des $a_w < 0,9$) tandis que d'autres ne supportent pas des pressions osmotiques élevées comme les bactéries coliformes et *Geotrichum candidum* (jusqu'à une a_w de 0,975) (Mahaut *et al.*, 2000). Dans les fromages, l' a_w dépend essentiellement des teneurs en sel et en eau. Au cours de l'affinage, l' a_w diminue, pouvant atteindre des valeurs proches de 0,9 comme c'est le cas du Parmesan tandis que pour les fromages de type pâte pressée non-cuite, l' a_w peut varier entre 0,92 et 0,98 en fonction de la durée de l'affinage. Or, l' a_w minimale autorisant la croissance d'*E. coli* O157:H7 est comprise entre 0,945 et 0,95 (Lindblad & Lindqvist, 2010 ; Salter *et al.*, 2000 ; Sperber, 1983). Glass *et al.* (1998) ont observé qu'une a_w de 0,92 dans des portions de fromages était suffisante pour inhiber *E. coli* O157:H7. Même si les *E. coli* possèdent de nombreux systèmes pour lutter contre le stress osmotique (Peng *et al.*, 2011), la chute de l' a_w au cours de l'affinage du fromage peut avoir un impact sur leur croissance et leur survie.

En conclusion, l' a_w apparaît comme un « effet barrière » contre les STEC pour certaines technologies fromagères.

6.3.c. Phénomènes de compétition

Chaque lait non-traité thermiquement ou physiquement possède une microflore qui lui est propre. Or, la microflore naturelle du lait cru utilisée lors de la fabrication de fromage ainsi que les ferments ajoutés peuvent eux aussi avoir un impact direct sur la survie des STEC (Duffy *et al.*, 1999). Néanmoins, les connaissances relatives aux interactions entre les STEC et la flore naturelle du lait sont encore très rares (Baylis, 2009 ; Lee *et al.*, 2012). Une compétition nutritive et/ou la production de substances antimicrobiennes par ces flores pourraient avoir un effet inhibiteur sur les STEC.

En ce qui concerne la production de substances inhibitrices, les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire afin de protéger les aliments, ainsi que celles naturellement présentes, produisent différentes substances comme l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène ou même des bactériocines (De Vuyst & Vandamme, 1992). Maher *et al.* (2001) ont observé que durant l'affinage d'un fromage à croûte fleurie, la décroissance d'*E. coli* O157:H7 était concomitante à la formation de la flore sur la croûte. Ils ont supposé que cette flore produisait une substance antimicrobienne ayant un effet létale sur *E. coli* O157:H7 au niveau de la croûte du fromage. Les bactériocines quant à elles sont des peptides connus pour leur effet antimicrobien (Gálvez *et al.*, 2007). L'une de ces bactériocines, la nisine, a été testée sur *E. coli* O157:H7 durant la fabrication et la conservation de Féta et de Camembert mais sans pouvoir démontrer un effet bactéricide sur les STEC étudiés (Ramsaran *et al.*, 1998). A l'inverse, Murdock *et al.* (2007) ont démontré, *in vitro*, un effet létal sur *E. coli* O157:H7 de la nisine couplée à la lactoferrine. De même, el-Ziney & Debevere (1998) ont observé un effet inhibiteur sur *E. coli* O157:H7 d'une autre bactériocine, la reutérine produite par *Lactobacillus reuteri* dans un fromage frais. Ces différents travaux prouvent que les bactériocines peuvent avoir un effet inhibiteur sur *E. coli* O157:H7, mais de nombreux travaux seront nécessaires afin de pouvoir pleinement appréhender et maîtriser leur impact sur *E. coli* O157:H7 mais également sur les autres sérotypes de STEC.

En ce qui concerne les compétitions nutritives, peu de données sont actuellement disponibles pour pouvoir statuer sur ce phénomène. La richesse microbiologique du lait cru tendrait à émettre l'hypothèse d'une forte compétition nutritionnelle entre les différents micro-organismes naturellement présents et les STEC. Néanmoins, certains travaux laissent à supposer le contraire. En effet, des auteurs ont mis en évidence que la croissance de *E. coli* n'était pas impactée par l'utilisation de ferments ni même par la flore naturelle du lait cru au cours de la fabrication d'un fromage danois (Masoud *et al.*, 2012). Ramsaran *et al.* (1998) ont aussi démontré que l'utilisation de lait cru ou pasteurisé n'influçait que peu le comportement d'*E. coli* O157:H7 dans de la Féta ou le Camembert. Delbès *et al.* (2013) ont aussi observé que les ferments n'avaient pas d'impact sur la croissance d'une souche *E. coli* O26:H11 dans un fromage de type pâte pressée non cuite au lait pasteurisé. De plus, Lee *et al.* (2012) ont démontré que, *in vitro*, 2 souches de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium camemberti* favorisaient la croissance d'*E. coli* O157:H7 dans différentes conditions d'acidité. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'alcalinisation du milieu par les moisissures permettait d'augmenter la croissance des STEC. Néanmoins, ces résultats ayant été obtenus *in vitro*, il sera aussi nécessaire de pouvoir les confirmer dans le fromage. En revanche, Delbès *et al.* (2013) ont pu démontrer le caractère inhibiteur sur les STEC d'une bactérie généralement présente dans le lait cru, *Hafnia alvei*.

6.3.d. Potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction est la capacité à accepter ou à céder des électrons. Plus un aliment est épais et compact, plus son cœur est réducteur. A l'inverse, un aliment peu épais et exposé à l'air ne peut pas devenir réducteur : l'effet oxydant d'un aliment est dû essentiellement à la présence d'oxygène atmosphérique. Le potentiel redox joue un rôle important dans la croissance des micro-organismes. En effet, certaines microflore aérobies strictes ne pourront se développer qu'à la surface du fromage comme les moisissures tandis que d'autres microflore anaérobies strictes ne se développeront qu'à l'intérieur du fromage.

Actuellement, l'impact du potentiel redox des fromages sur les STEC n'est pas connu.

6.4. Facteurs environnementaux ayant un impact sur les STEC au cours de la fabrication et l'affinage du fromage

6.4.a. Composition de l'atmosphère

L'impact de la composition de l'atmosphère des caves d'affinage sur le développement des STEC est peu connu. Néanmoins, certains facteurs pourraient favoriser la survie des STEC comme la présence d'ammoniac dans les caves d'affinage des fromages de type pâte molle qui contribue à favoriser le développement de la flore acidosensible (Mahaut *et al.*, 2000). A l'inverse, l'humidité relative des caves d'affinage conditionne l' a_w qui, en cas de diminution, peu s'avérer être un facteur létal pour les STEC.

6.4.b. La température

Les températures au cours de la fabrication et de l'affinage sont variables. De plus, des traitements thermiques peuvent être appliqués au cours de la fabrication de certaines technologies fromagères. Schlessner *et al.* (2006) ont observé qu'un traitement thermique du lait cru à 64,4 °C pendant 17,5 secondes permettait une réduction de 5 logarithmes décimaux de la concentration d'*E. coli* O157:H7 inoculés artificiellement dans ce lait à un taux de 10^5 UFC.mL⁻¹. Le lait peut aussi être pasteurisé. Ce procédé est extrêmement efficace pour assainir le lait de tous les pathogènes dont les STEC. En effet, *E. coli* O157:H7 peut être complètement détruit après un traitement de 16 s à 72 °C (D'Aoust *et al.*, 1988). Néanmoins, la pasteurisation n'est pas non plus garante d'un produit sans danger : le risque de contamination du lait/fromage après pasteurisation ou suite à un défaut de cette étape existe (Clough *et al.*, 2009). En effet, deux épidémies à *E. coli* O157:H7 dans du lait pasteurisé ont été provoquées suite à défaillance de pasteurisation pour l'une et une contamination post-pasteurisation pour l'autre (Baylis, 2009).

Dans le cas des fromages au lait cru, les températures usitées pour certaines technologies peuvent avoir des effets différents. En premier lieu, l'étape de coagulation est généralement effectuée à des températures comprises entre 25 et 35 °C en fonction des technologies. Ces températures sont indispensables à l'emprésurage, à la formation du caillé ainsi qu'à la croissance de la flore naturelle du lait et des ferments lactiques. Cependant, la croissance

des STEC peut également être favorisée à ces températures. En effet, la température optimum de croissance d'*E. coli* O157:H7 dans le lait et les produits laitiers se situe aux alentours de 37°C (Reitsma & Henning, 1996 ; Wang *et al.*, 1997).

Certaines technologies comme les pâtes filées ou pâtes pressées cuites nécessitent une étape de chauffage du caillé. Les fromages de type pâtes filées comme la Mozzarella sont caractérisés par une étape de chauffage du caillé après un présage dans de l'eau ou du lactosérum pendant 5 à 10min à des températures comprises entre 70 et 85 °C. Spano *et al.* (2003) ont observé que cette étape de chauffage à 70 °C durant 5 min permettait une réduction d'un facteur 10 du taux *E. coli* O157:H7 initialement inoculé à 10⁵ UFC/mL tandis qu'après un chauffage de 5 min à 80 °C, plus aucun de ces STEC n'était cultivable. Pour les fromage de type pâte pressée cuite, cette étape de chauffage dure généralement entre 30 et 60 min pour des températures comprises entre 53 et 55 °C (Mahaut *et al.*, 2000). Il a été démontré qu'une température de 53 °C ou plus entraînait une rapide décroissance du taux de STEC dans les premières heures de fabrication (Peng *et al.*, 2011). Hudson *et al.* (1997) ont observé que l'étape de cuisson de 2 heures à 56 °C entraînait une disparition des *E. coli* O157:H7 dans du fromage blanc. Usajewicz & Nalepa (2006) ont observé qu'un traitement de 180 min à 55 °C permettait d'inactiver les *E. coli* dans le lait. Ils ont aussi noté que ces bactéries pouvaient réparer les dommages subits après un passage dans des conditions optimales (37 °C) tandis qu'un stockage à 7 °C inhibait leur régénération. Or, pour certaines technologies de pâtes pressées cuites, les fromages peuvent être conservés plus de 24h à 20°C après une étape de chauffage de 35min à 52°C (Mahaut *et al.*, 2000), ce qui pourrait permettre une régénération des souches de STEC.

Plusieurs facteurs peuvent être impliqués en cas de stress thermiques, comme des protéines chaperonnes appelée HSP (Heat Shock Protein). Certaines de ces HSP sont régulées par le facteur σ^{32} (RpoH) (Peng *et al.*, 2011).

Lors de l'affinage et la conservation du fromage, les STEC sont alors soumis à des températures basses (< 12 °C). Il a été observé qu'*E. coli* O157:H7 pouvait survivre de 60 à 75 jours respectivement dans du Camembert et de la Féta à 2 °C (Ramsaran *et al.*, 1998), ainsi que 60 jours dans Cheddar à 7 °C (Schlesser *et al.*, 2006). Comme il a été expliqué précédemment, le stress acide que subissent les STEC en début de fabrication est à même

d'activer des mécanismes de résistance au stress froid, ce qui peut expliquer ces observations.

En conclusion, la température joue un rôle important dans le devenir des STEC au cours de la fabrication du fromage. Pour les technologies dépourvues d'étape de cuisson, la température pourrait tour à tour agir comme facteur de croissance puis comme facteur de préservation des STEC dans le produit. Pour les pâtes pressées cuites, l'étape de cuisson s'avère efficace afin de réduire/détruire les STEC. Néanmoins, les STEC semblent capable de se régénérer si les conditions sont favorables.

6.5. Conclusion

En conclusion, différents facteurs peuvent intervenir dans le devenir des STEC au cours de la fabrication du fromage. L'acidité, bien que généralement décrite comme un facteur létal pour les pathogènes, ne semble pas être un facteur inhibiteur des STEC : ces bactéries possèdent des mécanismes de résistance à l'acidité. L'acidité du fromage pourrait même déclencher une réponse globale aux stress et ainsi préparer ces micro-organismes à affronter d'autres stress comme par exemple le pH extrêmement acide de l'estomac humain. Si les taux de NaCl présents dans le fromage ne semblent pas être en mesure d'inhiber les STEC, la chute de l' a_w au cours de l'affinage pourrait, elle, avoir un impact sur la survie de ces bactéries. Les étapes de chauffage des fromages à pâtes pressées cuites présentent elles aussi un impact direct sur la survie des STEC. En ce qui concerne les interactions entre les STEC et les autres flores présentes dans le fromage, les connaissances sont encore peu nombreuses et parfois contradictoires. Mais il est important de rappeler que de multiples barrières sont bien plus efficaces qu'une seule (Erickson & Doyle, 2007). Le fromage est une matrice très complexe, tous ces facteurs interviennent de façon synergique et séquentielle et pourraient ainsi avoir bien plus d'impact sur le devenir des STEC.

7. Comportement des STEC au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages

Le but de cette partie est de faire un point sur les connaissances relatives au comportement des STEC au cours de la fabrication et de l'affinage de différents types de fromage. Tout d'abord, il est nécessaire de rappeler que le taux de contamination des STEC dans le lait est très faible (Baylis, 2009) et qu'il est aussi très difficile de pouvoir détecter/isoler de faibles quantités de ces bactéries (Jordan & Maher, 2006). C'est pourquoi, généralement, lors de ces études, les STEC sont artificiellement inoculés à des taux bien au dessus des 1 UFC.mL⁻¹, généralement supérieurs à 10³ UFC.mL⁻¹ avant de procéder à la fabrication des fromages (Montet *et al.*, 2009 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Reitsma & Henning, 1996).

Deux phases jouent un rôle important dans le devenir des STEC : le début de la fabrication et l'affinage. Les conditions initiales de la fabrication du fromage sont plutôt optimales pour la croissance des STEC avec généralement une température de 30°C ainsi que qu'une a_w du lait de 0,99. De plus, l'étape de coagulation, permettant de passer du lait liquide au caillé solide, entraîne un phénomène de concentration des bactéries. En effet, plusieurs auteurs ont pu observer une augmentation importante du taux d'*E. coli* O157:H7 après la phase de découpage du caillé (Govaris *et al.*, 2002 ; Maher *et al.*, 2001 ; Reitsma & Henning, 1996). Cette augmentation est probablement le résultat d'un phénomène de croissance associé à la rétention/concentration de ces bactéries dans le caillé. Dans le Cheddar, *E. coli* O157:H7 reste bien plus concentré à l'intérieur des grains de caillé que dans le lactosérum expulsé ce qui tendrait à confirmer l'hypothèse de la concentration de ces bactéries dans le caillé lors de la phase de coagulation (Reitsma & Henning, 1996 ; Schlessner *et al.*, 2006). A l'inverse, au cours de l'affinage et la conservation du fromage, les STEC sont soumis à de nombreux stress, dus aux facteurs mentionnés précédemment, pouvant entraîner une diminution du taux d'*E. coli* O157:H7 / des STEC durant cette étape.

Ces différents phénomènes ont été décrits dans la littérature. Certains exemples sont illustrés ci-dessous.

Le phénomène d'augmentation du taux de STEC (concentration avec ou sans croissance) lors des premières heures de fabrication du fromage a été décrit dans des fromages de type Féta et Télémé fabriqués à base de lait cru de brebis ou de vache. Govaris *et al.* (2002) ont observé une augmentation de *E. coli* O157:H7 de près de 1,18 et 0,82 \log_{10} UFC.g⁻¹ pour la Féta et 1,56 et 1,35 \log_{10} UFC.g⁻¹ pour le Télémé au cours des 10 premières heures de la fabrication. En revanche, *E. coli* O157:H7 ne semble plus détectable après, respectivement, 44 et 36 jours d'affinage dans la Féta et le Télémé (Govaris *et al.*, 2002). Hudson *et al.* (1997) ont aussi observé une augmentation avoisinante un facteur 10 du taux de *E. coli* O157:H7 dans les premières heures de la fabrication de fromages au lait cru de type Féta, Colby et Romano. Au cours de l'affinage, ils ont noté une diminution du taux de ces bactéries. Au-delà de 30 jours, plus aucun *E. coli* O157:H7 n'était viable. Ramsaran *et al.* (1998) ont observé qu'après l'inoculation d'*E. coli* O157:H7 à un taux de 10⁴ UFC.mL⁻¹ dans du lait cru ou pasteurisé de vache, *E. coli* O157:H7 parvenait à atteindre un taux de 10⁶ UFC.g⁻¹ et à s'y maintenir pendant près de 75 jours. Maher *et al.* (2001) ont aussi noté une augmentation de la concentration de plus de 2 \log_{10} UFC.g⁻¹ d'une souche *E. coli* O157:H7 artificiellement inoculée au cours des 24 premières de fabrication d'un fromage à croûte lavée. Au cours de l'affinage, le taux de cet STEC a diminué jusqu'à atteindre moins de 1 UFC.g⁻¹ dans la croûte et moins de 10 UFC.g⁻¹ dans la pâte du fromage. Néanmoins, des souches viables ont pu être isolées après enrichissement jusqu'à 90 jours.

Une étude réalisée sur du Camembert a permis de mettre en évidence que des souches STEC transformées non-O157:H7 inoculées à 10³ UFC/mL pouvaient augmenter d'environ 1 à 2,2 \log_{10} UFC/g pendant les premières heures de la fabrication du fromage (Montet *et al.*, 2009). Montet *et al.* (2009) ont observé que ces STEC étaient toujours isolables et dénombrables malgré une légère diminution du taux de certaines souches (taux compris entre 10 et 10⁴ UFC.g⁻¹ en fonction des souches) en fin d'affinage (20 jours).

Reitsma & Henning (1996) avaient testé 2 taux d'inoculation d'*E. coli* O157:H7. Dans les fromages dont les laits avaient été inoculés à 10³ UFC.mL⁻¹, les *E. coli* O157:H7 avaient pu survivre jusqu'à 158 jours. Dans les fromages dont les laits avaient été inoculés à 10 UFC.mL⁻¹ aucune souche n'avait pu être détectée après 130 jours. Le taux initial de STEC dans le lait aurait donc une incidence sur leur survie dans le fromage.

D'Amico *et al.* (2010) ont pu montrer la survie de souches de *E. coli* O157:H7 au cours de la fabrication de Gouda et de Cheddar avec du lait cru expérimentalement inoculés avec *E. coli* O157:H7 à 20 UFC.mL⁻¹. Le taux d'*E. coli* O157:H7 a augmenté d'un facteur 10 en début de fabrication, puis a diminué progressivement au cours de l'affinage. Néanmoins, pour les 2 types de fromage, les souches étaient détectables après enrichissement jusqu'à 270 jours.

Schlesser *et al.* (2006) ont aussi observé que le taux de souches *E. coli* O157:H7 inoculées dans du lait cru pouvait augmenter d'un facteur 10 à 100 lors des premières étapes de la fabrication d'un fromage de type Cheddar et être isolables après enrichissement au bout de 240 jours d'affinage.

Peng *et al.* (2012) ont observé que des souches STEC non-O157:H7 et des souches *E. coli* non-STEC inoculées à 10¹ et 10³ UFC.mL⁻¹ pouvait croître d'environ 3,5 log₁₀ UFC.g⁻¹ au cours de la fabrication d'un fromage au lait cru de vache de type pâte pressée cuite. Les 2 types de cuisson modérée du caillé à 40 °C et 46 °C n'ont pas inhibé les souches *E. coli* inoculées. Néanmoins, le taux de ces souches a diminué progressivement au cours de l'affinage, mais la plupart d'entre elles sont restées isolables après enrichissement au bout de 4 mois. Les auteurs ont toutefois noté que les 2 souches non-STEC inoculées ont présenté des taux de survie supérieurs à ceux des 3 souches STEC inoculées.

Vernozy *et al.* (2005b) ont mis en évidence que des STEC O157:H7 inoculés à un taux de 10, 100 et 1000 UFC.mL⁻¹ dans du lait cru de chèvre décroissaient au cours des 24 premières heures de la fabrication d'un fromage de type lactique chèvre jusqu'à un taux inférieur à 1 log₁₀ UFC.g⁻¹. Ils ont également montré qu'après le démoulage, les STEC n'étaient détectables qu'après enrichissement et ce, jusqu'à 42 jours après le début de la fabrication.

En conclusion, si le taux de STEC a tendance à augmenter lors des premières heures de la fabrication du fromage, celui-ci tend à décroître au cours de son affinage et sa conservation. Néanmoins, il est intéressant de noter que la plupart des expérimentations concernant la survie des STEC dans le fromage ont porté sur le sérotype O157:H7. Les travaux de Montet *et al.* (2009) ont porté sur des STEC non-O157:H7, mais il s'agissait de souches n'appartenant pas aux principaux sérotypes impliqués dans les épidémies. De plus, ces travaux sont généralement ciblés sur certains types de fromage comme le Cheddar, fromage de chèvre la Feta ou encore le Camembert. Or, étant donné l'immense diversité des fromages,

notamment en France, de nouvelles études seront nécessaires afin de mieux appréhender d'une part le comportement des STEC dans ce type d'aliment et d'autre part l'impact des facteurs physico-chimiques des différentes technologies fromagères sur ces bactéries.

8. Comportement au cours de la digestion

Les différents mécanismes présentés précédemment permettent aux STEC de survivre dans des environnements très acides. Montet *et al.* (2009) ont observé que des souches STEC artificiellement inoculées dans un fromage de type pâte molle et placées dans un fluide gastrique à pH de 2,5 restaient isolables après 40 min pour les souches acido-sensibles et après 120 min pour les souches acido-résistantes. Si la survie des STEC dans le compartiment stomacal le temps de la digestion est établie, le comportement de ces bactéries au cours de du transit dans les différents compartiments du tube digestif est relativement peu connu. Les travaux réalisés par Etienne-Mesmin *et al.* (2011) à l'aide d'un digesteur artificiel permettant de simuler les conditions physico-chimiques de l'estomac ainsi que du duodénum, du jéjunum et de l'iléon ont permis de démontrer qu'une souche de *E. coli* O157:H7 artificiellement inoculée dans de la viande hachée parvenait à survivre au cours de la digestion artificielle de cet aliment. Ils ont observé une diminution du taux de cette souche dans l'estomac et le duodénum puis une reprise de croissance de cette souche au bout de 300 min au niveau du jéjunum et de l'iléon. Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens : quel est le comportement des souches STEC non-O157 ? Le type d'aliment a-t-il une influence sur le devenir des STEC au cours de la digestion ? De plus, Etienne-Mesmin *et al.* (2011) ont observé que *S. cerevisiae* réduisait significativement la reprise de croissance de la souche *E. coli* O157:H7 testée. Qu'en est-il de l'influence de la microflore présente dans certains types d'aliments (fromages au lait cru...) ainsi que de la microflore commensale de l'être humain ?

Points clefs

- ➔ Les STEC sont omniprésents dans les fermes. Ces bactéries sont extrêmement persistantes et peuvent même survivre plusieurs mois dans l'environnement, rendant leur éradication quasi impossible.

- ➔ Les STEC ont été responsables d'épidémies suite à la consommation de produits laitiers le plus souvent à base de lait cru. Cependant, elles sont de faible ampleur en comparaison avec des épidémies impliquant d'autres matrices alimentaires.

- ➔ Des mesures de préventions peuvent être appliquées pour limiter le danger lié aux STEC dans le lait et les différents produits laitiers. Ces mesures sont complémentaires aux contrôles réalisés sur le lait ainsi que sur les produits laitiers afin de déterminer s'il y a présence ou non de STEC.

- ➔ Les fromages sont des matrices très complexes. Chaque fromage possède ses propres caractéristiques. Ainsi, il est difficile de pouvoir généraliser toutes les études sur la survie des STEC dans ces matrices tant elles sont différentes les unes des autres. Malgré un nombre important de stress au cours de la fabrication fromagère, les STEC ont su développer des mécanismes de résistance à ceux-ci. Néanmoins, les étapes de chauffage du caillé, d'acidification longue ou encore la chute d' a_w au cours de l'affinage de certaines technologies fromagères peuvent être efficaces contre les STEC.

Valorisation

Mon travail bibliographique a été valorisé par la participation à la rédaction d'un chapitre (chapitre 8 : «Survival of STEC during cheesemaking ») d'une revue bibliographique :

Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production.

Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, **Miszczycha S**, Moussiegt S, Verstraete K, Cerf O.

International Journal of Food Microbiology. 2012. *In press*.

Cette publication est disponible en Annexe 4.

Conclusion du mémoire bibliographique

Le nom « STEC » regroupe les *E. coli* porteurs d'un ou de plusieurs gènes *stx* et dont certaines souches ont été impliquées dans des épidémies. La toxine encodée par ce gène rend ces bactéries potentiellement pathogènes, même si actuellement, et en dépit de la caractérisation de nombreux autres facteurs de virulence, les mécanismes responsables de la pathogénicité de ces bactéries ne sont pas encore totalement connus.

Les différentes données présentées tout au long du mémoire bibliographique ont démontré que les STEC sont présents dans les fromages et que ce type d'aliment a déjà été incriminé dans des épidémies liées à ces bactéries. Or, l'éradication des STEC au niveau des animaux mais aussi de l'environnement fermier paraît utopique. C'est pourquoi un maximum de précautions et de règles d'hygiène doivent être respectées afin de limiter la transmission des STEC d'un animal à l'autre au sein de l'exploitation, de limiter le plus possible la persistance et donc la re-contamination des animaux et d'agir au mieux afin d'éviter toute contamination fécale au moment de la traite. Des contrôles doivent aussi être réalisés sur le lait afin de déterminer s'il y a présence ou non de STEC. Ces contrôles doivent aussi être effectués sur le fromage lui-même car les STEC possèdent de nombreux mécanismes leur permettant de survivre à la fabrication d'un fromage.

Néanmoins, les données disponibles sur le comportement des STEC dans diverses technologies fromagères sont encore rares et généralement ciblées sur le seul sérotype O157:H7. De plus, très peu de données sont disponibles quant au comportement au cours de la digestion des STEC présents dans les fromages.

Mémoire expérimental

Avant propos.

Les différents travaux cités tout au long du mémoire bibliographique ont permis de mesurer la prévalence des STEC dans les fromages mais aussi leur implication dans des épidémies. Néanmoins, l'étude bibliographique a souligné le manque de connaissances sur le comportement des STEC non-O157:H7 dans les différentes technologies fromagères notamment françaises. Cette première partie de l'étude expérimentale tentera d'apporter une réponse aux deux questions suivantes :

- Les technologies fromagères possèdent différentes caractéristiques physico-chimiques pouvant avoir un effet antagoniste sur les STEC (acidité, température, a_w ...), mais dans quelle mesure impactent-elles la croissance et la survie des STEC?

- La plupart des études concernant le comportement des STEC dans les fromages ont été focalisées sur le sérotype O157:H7, pourtant la prévalence du sérotype O26:H11 dans les fromages est bien plus importante que celle du sérotype O157:H7. Qu'en est-il du comportement des STEC non-O157:H7 au cours de la fabrication de fromages?

CHAPITRE 3. Etude du comportement de différents sérotypes de STEC dans les matrices fromagères à base de lait cru

1. Introduction

Tout au long des chapitres précédents, il a été démontré que les STEC représentent une importante cause de toxi-infections alimentaires, associées à des symptômes graves tels que la diarrhée hémorragique, le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et pouvant même provoquer la mort (Nataro & Kaper, 1998 ; Paton & Paton, 1998). Ces infections sont essentiellement, comme cela a été décrit précédemment, liées à la consommation d'aliments (produits carnés, végétaux, produits laitiers, eau...) contaminés par ces bactéries (Baylis, 2009 ; Espié *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 2006 ; Karmali *et al.*, 2010 ; Mellmann *et al.*, 2011 ; Pearce *et al.*, 2006).

E. coli O157:H7 a été le premier STEC isolé dans les années 1980 et il a été impliqué dans la plupart des épidémies et cas de SHU (Karmali *et al.*, 2010 ; Riley *et al.*, 1983). Néanmoins, d'autres sérotypes tels que les sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 apparaissent à l'heure actuelle comme étant de plus en plus impliqués dans des épidémies liées à ces bactéries (Lin *et al.*, 2011).

Les ruminants et plus précisément les bovins, sont le principal réservoir de STEC (Karmali *et al.*, 2010). Ces bactéries colonisent leur tractus digestif de façon asymptotique et sont excrétées dans les fèces de ces animaux (Chapman *et al.*, 2001 ; Hancock *et al.*, 1998 ; Sarimehmetoglu *et al.*, 2009). Néanmoins, d'autres animaux tels que les ovins ou les caprins peuvent être porteurs de STEC (Ateba & Mbewe, 2011). Ces animaux semblent aussi être

des réservoirs d'*E. coli* appartenant à des sérogroupes très variés, voire différents des bovins (O26, O91, O115, O128 ou O130) (La Ragione *et al.*, 2009).

La présence des gènes de virulence ou de STEC dans les produits laitiers a été observée dans de nombreuses publications (Stephan *et al.*, 2008 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2005a). Or, si un lait est contaminé par des STEC et que celui-ci est utilisé en fromagerie, ces bactéries peuvent être à même de survivre à la fabrication de certains fromages (D'Amico *et al.*, 2010; Govaris *et al.*, 2002; Montet *et al.*, 2009). La présence de bactéries pathogènes dans ces matrices alimentaires est une préoccupation majeure pour les fromagers d'autant que le paquet hygiène les oblige à mettre sur le marché des produits indemnes de contaminations pathogènes. Certaines administrations comme l'U.S. Food and Drug Administration ont tenté d'apporter des solutions, notamment en conseillant un affinage minimum de 60 jours pour les fromages au lait cru (D'Amico *et al.*, 2010 ; Schlessner *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles quant aux comportements des STEC et notamment des STEC non-O157 dans les matrices fromagères au lait cru (D'Amico *et al.*, 2010 ; Govaris *et al.*, 2002 ; Lekkas *et al.*, 2006 ; Leuschner & Boughtflower, 2002 ; Maher *et al.*, 2001 ; Reitsma & Henning, 1996 ; Schlessner *et al.*, 2006). Afin de mieux appréhender le comportement de ces bactéries dans diverses technologies fromagères, la croissance et la survie de souches STEC de sérotype O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O157:H7 a été suivie au cours de la fabrication, de l'affinage ainsi que de la conservation de différents types de fromages au lait cru. L'approche choisie était celle de type challenge-test et a consisté à inoculer artificiellement des souches de STEC dans du lait cru, puis de procéder à la fabrication des différents fromages et d'étudier le comportement des STEC tout au long de la fabrication et de l'affinage des fromages ainsi que l'étude de la perte possible du gène *stx* comme cela a déjà été décrit (Bielaszewska *et al.*, 2007). Au total, cinq types de technologies fromagères ont été testés : un fromage de type pâte persillée (lait cru de brebis), deux fromages de type pâte pressée non-cuite (avec affinage long et affinage court au lait cru de vache), un fromage de type pâte pressée cuite (lait cru de vache) et un dernier fromage de type lactique chèvre (lait cru de chèvre).

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes

Huit souches différentes de STEC appartenant à la collection du laboratoire ont été utilisées lors de ces expérimentations (Tableau 8). Trois de ces souches appartenaient au sérotype O26:H11, deux au sérotype O103:H2, une au sérotype O145:H28 et deux au sérotype O157:H7. Le choix de ces sérotypes a été réalisé en fonction de leur implication dans des épidémies (Karmali *et al.*, 2003) et de leur prévalence dans les produits laitiers (DGAL, 2010 ; Farrokh *et al.*, 2012). Les souches employées ont toutes été isolées à partir de produits laitiers et possèdent les gènes de virulences *eae* et *stx1* ou *stx2* (Nielsen & Andersen, 2003 ; Perelle *et al.*, 2004). Toutes les souches ont été conservées à l'aide de cryo-billes (AEB 400100, laboratoire AES, Combourg, France) à -80 °C.

2.2. Inoculation

Les souches ont été revivifiées dans du bouillon cœur-cerveille (BHI, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à 37°C pendant 24 h. Puis 100 µL de la culture bactérienne obtenue ont été ajoutés à 10 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT, bioMérieux). La suspension a ensuite été incubée 24 h à 37 °C, puis placée pendant 48 h à 8°C afin de mimer les conditions de stockage du lait et d'obtenir des souches adaptées au froid. La concentration des souches a été évaluée par mesure de la turbidité à l'aide d'un Densimat (bioMérieux). Puis, la suspension bactérienne a été diluée de façon à inoculer le lait cru avant l'étape d'emprésurage (Figure 15) à un taux de 10^2 UFC.mL⁻¹. En parallèle, un dénombrement a été effectué sur des géloses de types PCA (Plate Count Agar, bioMérieux) afin de contrôler la concentration de l'inoculum. Les géloses ont été incubées 24 h à 37 °C.

Le choix des souches et des sérotypes testés lors des challenges tests a été effectué en fonction des technologies fromagères : pour les « petits » fromages (type pâte pressée non-cuite et lactique chèvre) caractérisés par une période d'affinage courte, les 8 souches de

STEC choisies pour l'étude ont pu être testées. A titre de rappel, toutes les souches testées appartenaient aux sérotypes définis comme potentiellement pathogènes par l'ANSES (AFSSA, 2010).

Au contraire, pour les fabrications de fromages volumineux nécessitant une logistique importante du fait de leur taille mais aussi de leurs longues durées d'affinage (> 4 mois) (fromage de type pâte pressée cuite, pâte pressée non cuite à affinage long et pâte persillée), seules certaines souches et certains sérotypes ont pu être testés. Les sérotypes O26:H11 et O157:H7 ont été choisis en priorité du fait de leurs implications dans les épidémies (Baylis, 2009 ; Espié *et al.*, 2006c ; Farrokh *et al.*, 2012). Les sérotypes O103:H2 et O145:H28, ont quant à eux été testés lorsque cela a été possible. Ils ont été choisis à cause de leurs implications dans des épidémies mais également à cause du manque d'informations sur leur comportement dans les produits laitiers

Par ailleurs, les souches STEC issues de la collection du laboratoire (LMAP-EMSA-CALITYSS, Marcy l'Etoile, France) ont été choisies et inoculées dans les laits en fonction de leur origine. Par exemple, pour le fromage de type pâte persillée à base de lait de brebis, seules des souches issues de lait de brebis ont été testées. La seule exception concernait les souches de sérotypes O157:H7 : aucune souche de ce sérotype possédant les gènes de virulence *eae* et *stx* issue de lait/fromage de vache n'était disponible dans la collection du laboratoire.

Toutes les souches ont été inoculées de façon individuelle dans le lait avant la phase d'emprésurage. Les expérimentations ont été répétées 3 fois (pour le fromage de type pâte pressée cuite, les souches ont été inoculées en duplicata).

Tableau 8. Souches utilisées lors de cette étude.

Sérotype	Nom (origine)	Gènes de Virulence		PP	PPNC1-AL	PPNC2-AC	PPC	LC
	7501A* (fromage: lait cru de vache)	<i>eae</i> ³	<i>stx1</i> ¹		X [†]	X [†]		X [†]
O26 ¹ :H11 ⁴	L23A* (lait de brebis)	<i>eae</i> ³	<i>stx1</i> ¹	X [†]		X [†]	X [‡]	X [†]
	F15338* (fromage: lait cru de vache)	<i>eae</i> ³	<i>stx1</i> ¹			X [†]		X [†]
O103 ² :H2 ⁴	F73120* (fromage: lait cru de vache)	<i>eae</i> ³	<i>stx1</i> ¹			X [†]		X [†]
	F12983a* (lait de brebis)	<i>eae</i> ³	<i>stx1</i> ¹	X [†]		X [†]		X [†]
O145 ¹ :H28 ⁴	F324* (fromage: lait cru de vache)	<i>eae</i> ³	<i>stx2</i> ¹			X [†]		X [†]
	721.4* (lait de brebis)	<i>eae</i> ³	<i>stx2</i> ¹	X [†]	X [†]	X [†]	X [‡]	X [†]
O157:H7 ⁵	6222-16.3* (fromage: lait cru de chèvre)	<i>eae</i> ³	<i>stx2</i> ¹			X [†]		X [†]

PP = pâte persillée, PPNC1-AL: pâte pressée non-cuite avec affinage long, PPNC2-AC: pâte pressée non-cuite avec affinage court, PPC = pâte pressée cuite et LC = lactique chèvre. [†] n=3 ; [‡] n=2 ; * Toutes les souches sont issues de la collection du laboratoire national de référence des STEC français. ¹ Perelle *et al.*, 2004 ; ² Perelle *et al.*, 2005 ; ³ Nielsen *et al.*, 2003 ; ⁴ Madic *et al.*, 2010 ; ⁵ Miszczycha *et al.*, 2012

2.3. Fabrication des fromages

Tous les fromages ont été fabriqués à l'Unité de Recherches Fromagères de l'INRA à Aurillac. Les 5 types de fromages testés représentent 5 grandes familles de fromages décrites par Lenoir *et al.* (1983) et Mahaut *et al.* (2000). Ces fromages sont de types : pâte persillée (PP) fabriquée à partir de lait cru de brebis, pâte pressée cuite (PPC), pâte pressée non-cuite à affinage long (PPNC1-AL), pâte pressée non-cuite à affinage court (PPNC2-AC) toutes 3 fabriquées à partir de lait cru de vache et lactique chèvre (LC) fabriqué à partir de lait cru de chèvre. Les diagrammes de fabrication de ces fromages sont présentés sur la Figure 15. Les protocoles complets de fabrication de ces fromages sont décrits en détail dans 2 ouvrages traitant de la fabrication fromagère et ont été élaborés en concertation avec les professionnels de l'industrie fromagère (Eck & Gillis, 1997 ; Luquet, 1985).

Pour chaque fabrication, les sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7 ont été recherchés afin de s'assurer que les laits utilisés n'étaient pas naturellement contaminés.

2.4. Analyse physico-chimique

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées à différents points de la fabrication du fromage. Ces points d'analyse ont été définis en fonction du type de fromage fabriqué et sur les conseils de technologues fromagers.

Le pH a été mesuré directement dans le cœur du fromage. Pour les technologies qui le permettaient, le pH a pu être testé dans la croûte après homogénéisation de celle-ci. Le pH a été mesuré avec un pH mètre 926 VTV équipé d'une électrode de type 406 MX (Mettler-Toledo SA, Viroflay, France). L'activité de l'eau (a_w) a été mesurée avec un LabMaster-aw (Novasina, Lachen, Suisse).

Les teneurs en lactate ont été mesurées par méthode enzymatique au laboratoire LARF (LARF-Actilait, Mamirolle, France).

2.5. Echantillonnage, dénombrement et détection des souches STEC

Des échantillons ont été prélevés dans le cœur et la croûte lorsque cela a été possible (pour les 2 PPNCs et la PPC) tout au long des fabrications, de l'affinage et de la conservation des fromages. Les points de prélèvements ont été choisis en accord avec les technologues fromagers à des étapes qui pouvaient avoir un impact sur le comportement des STEC (variation de pH, de la température...). Les prises d'essai ont été de 50 mL pour le lait et de 50 g pour les fromages. Les échantillons ont été dilués au 1/5 dans de l'EPT puis homogénéisés pendant 60 secondes à l'aide d'un stomacher (AES Chemunex, Bruz, France). Les suspensions ont ensuite été diluées au 1/10 à l'aide de bouillon tryptone-sel (TS, bioMérieux) et étalées sur des géloses spécifiques.

Pour le dénombrement des souches *E. coli* O157:H7, 100 µL des suspensions ont été étalées sur des géloses de type O157:H7 ID (bioMérieux) et de type SMAC (Biokar, Beauvais, France) complémentées de 0,05 mg.L⁻¹ de céfixime et de 2,5 mg.L⁻¹ de tellurite afin de limiter la croissance de la flore annexe. Ces mêmes géloses ont été utilisées sans céfixime ni tellurite afin de favoriser l'isolement des souches *E. coli* O157:H7 stressées.

Pour le dénombrement des souches *E. coli* O26:H11, O103:H2 et O145:H28, 100 µL des suspensions ont été étalés sur des géloses de type *E. coli* ID (bioMérieux) ainsi que la gélose sélective décrite par Possé *et al.* (2008).

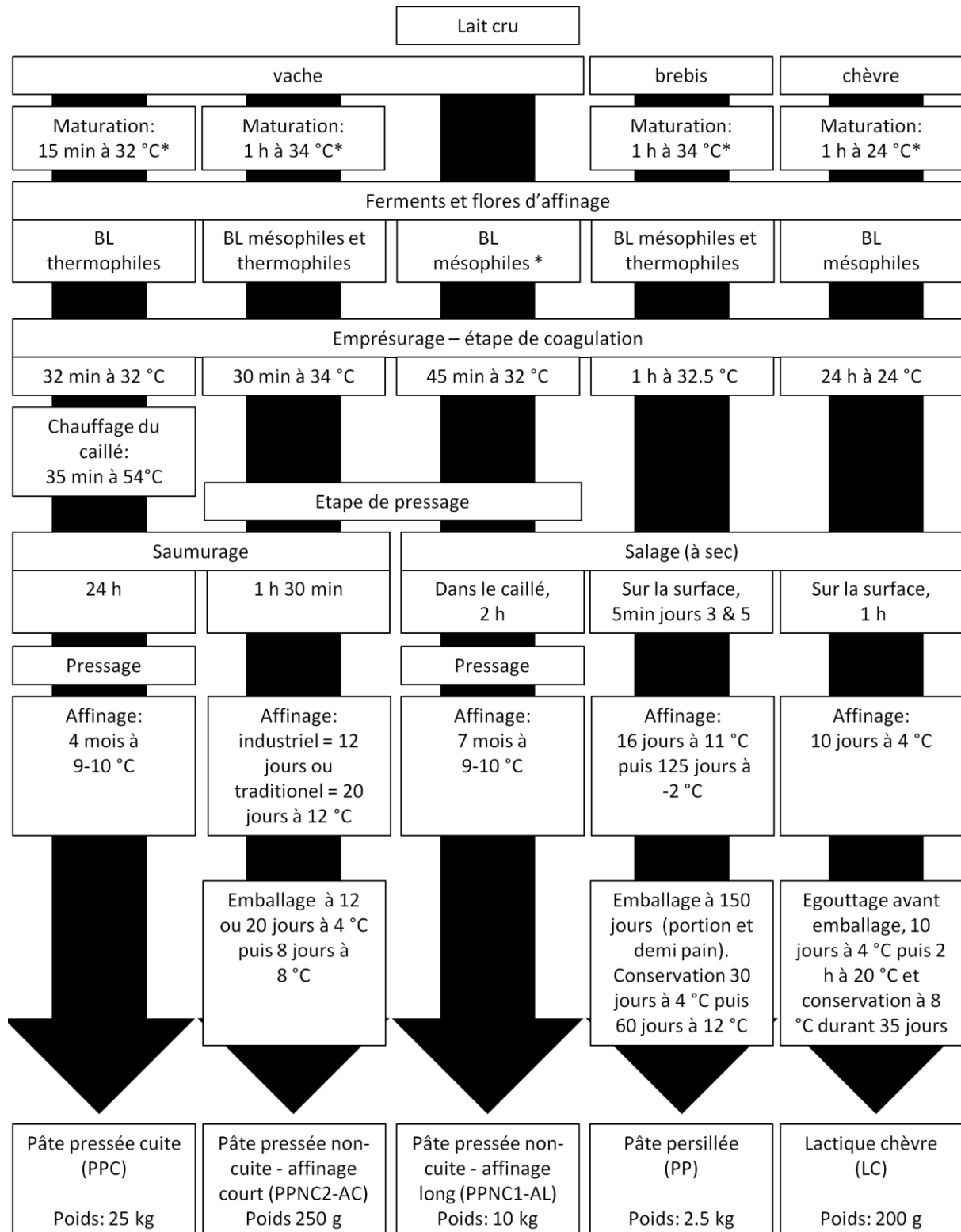
Tous les dénombrements ont été effectués en triplicata. Les géloses ont été incubées 24 h à 37 °C et le sérotype des souches isolées a été confirmé par PCR en temps réel comme décrit plus loin.

Lorsqu'aucune souche ne pouvait être dénombrée, un enrichissement était mis en œuvre. Cette étape a permis de déterminer la présence ou non de la bactérie recherchée dans l'échantillon. Pour cela, le reste de la suspension (échantillon + EPT) qui n'avait pas été utilisé pour le dénombrement a été complémenté par de l'acriflavine (inhibition de la croissance de la flore annexe) puis incubé 24 h à 41,5 °C pour les sérotypes O26:H11 et O157:H7 et 24 h à 37 °C pour les sérotypes O103:H2 et O145:H28 (Savoye *et al.*, 2011).

Figure 15. Diagramme présentant les caractéristiques des différents types de fromages testés.

BL = bactéries lactiques.

*: Inoculation des STEC.



Les souches ont alors été immuno-séparées du bouillon d'enrichissement à l'aide de billes magnétiques (technique de séparation immunomagnétique spécifique de chaque séro groupe ou IMS) sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques des sérogroupe recherché : des Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La suspension contenant les billes magnétiques obtenues après IMS a ensuite été étalée sur des géloses spécifiques comme décrit précédemment. En parallèle, un étalement direct du bouillon d'enrichissement a également été effectué sur ces mêmes géloses. Le sérotype des souches isolées a été confirmé par PCR en temps réel.

2.6. Confirmation et caractérisation des bactéries par PCR en temps réel

L'ADN bactérien a été extrait par ébullition (15 min) d'une colonie dans 250 µL d'eau DNA/DNAse free (Qiagen, Courtaboeuf, France). Puis, l'échantillon a été centrifugé 3 min à 13 000g. Le surnageant contenant l'ADN a ensuite été conservé à -20 °C.

Les gènes de virulence *eae* et *stx1* et/ou 2 ont été recherchés selon les protocoles décrits par, respectivement, Nielsen *et al.* (2003) et Perelle *et al.* (2004). Les sérogroupe O26, O103 et O145 ont été déterminés selon les protocoles décrit par Perelle *et al.* (2004 et 2005). Les flagelles H2, H11, H28 ont été déterminés selon le protocole décrit par Madic *et al.* (2010) et *E. coli* O157:H7 a été identifié selon le protocole décrit par Miszczycha *et al.* (2012).

Chaque réaction de PCR (30 µL) était composée de : 1X de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA), amorces et sondes aux concentrations décrites par les auteurs précédemment cités, 1X d'IPC (Internal Positive Control) Mix et ADN (Applied Biosystems), de l'eau DNA/DNAse free (Qiagen) et de 3 µL de la suspension d'ADN.

Les réactions de PCR en temps réel ont été effectuées à l'aide d'un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems).

2.7. Analyses statistiques

Afin d'étudier l'effet souche (LC et PPNC2-AC), l'effet sérotype (pour toutes les technologies fromagères testées), l'effet du type d'affinage (PPNC2-AC) et du mode de conservation (PP) sur le comportement des STEC tout au long de la fabrication du fromage, un modèle linéaire décrivant le taux de STEC sur une échelle logarithmique décimale a été utilisé comme fonction de deux variables dépendantes : le temps et l'effet étudié. Chaque modèle a donc été décrit comme suit :

$$Y = X\beta + \varepsilon$$

Y étant la variable quantitative à expliquer ou variable indépendante et représente le vecteur des données observées (c.à.d. les dénombrements) à l'échelle log décimal, X représentant les variables explicatives associées aux effets fixes (ici : souche, sérotype, temps d'affinage...), β étant un vecteur de coefficients associés aux effets fixes à estimer et ε étant un vecteur des erreurs aléatoires résiduelles autour de X β .

Les mesures étant répétées dans le temps à des intervalles de temps irréguliers il a été nécessaire d'utiliser un modèle « temps continu » pour décrire la matrice de covariance des erreurs résiduelles. La structure de covariance « spatial power » de la procédure Mixed de SAS 9.2 a donc été utilisée.

Pour chaque technologie, l'effet souche de chaque sérotype a été testé en premier (si plusieurs souches d'un même sérotype avaient été testées). Si aucun effet souche n'était observé au sein d'un même sérotype, alors l'effet sérotype était recherché. De plus, l'impact du type d'affinage (traditionnel ou industriel) pour le fromage de type PPNC2-AC et le mode de conservation pour le fromage de type PP (pain ou portion) ont été testés.

Les effets ont été considérés comme significatifs lorsque la p_{value} du test F était inférieure à 5%.

Les analyses statistiques ont été réalisées par la cellule AQR (Analyse Quantitative du Risque) du CNIEL.

3. Résultats

3.1. Fromage de type Pâte Persillée (PP – lait cru de brebis)

3.1.a. Comportement des STEC

Trois souches appartenant respectivement aux sérotypes O26:H11, O157:H7 et O103:H2 ont été testées (n=3) pour cette technologie fromagère (Tableau 8).

Pour ce type de fromage, le taux de la souche STEC O157:H7 a augmenté de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ lors des premières heures de fabrication tandis que cette augmentation a été, respectivement, de $2 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ et de $3 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ pour les souches STEC O103:H2 et O26:H11 étudiées (Figure 16). Sept jours après le début de la fabrication, la concentration de la souche *E. coli* O157:H7 a diminué jusqu'à ce que la souche ne puisse plus être détectée qu'après enrichissement. Les taux des souches *E. coli* O26:H11 et O103:H2 ont chuté au cours de l'affinage. Au 240^{ème} jour, les STEC O103:H2 et O157:H7 n'étaient plus détectables tandis qu'*E. coli* O26:H11 bien que non-dénombrable, restait détectable après enrichissement. Quel que soit le mode de conservation, la croissance d'*E. coli* O26:H11 a été significativement supérieure à celle des *E. coli* O103:H2 et O157:H7. La souche appartenant au sérotype O26:H11 a également été plus persistante que les autres ($p_{value} < 0,002$). Le mode de conservation (demi-pain ou portion) n'a pas présenté d'impact sur le devenir des souches STEC testées ($p_{value} > 0,9$ pour les 3 sérotypes).

3.1.b. Caractéristiques physico-chimiques

Quels que soient les STEC inoculés, le pH dans la pâte des fromages a diminué de 6,6 à 4,91 lors des 3 premiers jours de fabrication. Puis le pH a augmenté jusqu'au jour 90, atteignant une valeur de 6,69 avant de redescendre à nouveau (Figure 17). Les taux de lactate étaient de $1179 \text{ mg.100g}^{-1}$ (écart type (EC) = 41 mg.100g^{-1}) au 4^{ème} jour de fabrication et ont diminué au cours de l'affinage: ils ont atteint 638 mg.100g^{-1} (EC = 209 mg.100g^{-1}) au 150^{ème}

jour. L' a_w dans le pâte des fromages a diminué régulièrement jusqu'à atteindre 0,898 (EC = 0,006) au 240^{ème} jour. Les températures ont varié en fonction des conditions décrites dans le matériel et méthodes (Figure 15).

3.2. Fromage de type Pâte Pressée Non-Cuite avec un Affinage Long (PPNC1-AL – lait de vache)

3.2.a. Comportement des STEC

Deux souches appartenant respectivement aux sérotypes O26:H11 et O157:H7 ont été testées (n=3) pour cette technologie fromagère (Tableau 8).

Au cours des 24 premières heures de la fabrication, le taux d'*E. coli* O26:H11 a atteint 6 log₁₀ UFC.g⁻¹ tandis que le taux de *E. coli* O157:H7 a atteint 4 log₁₀ UFC.g⁻¹ (Figure 16). Le taux des STEC est ensuite resté constant jusqu'au 60^{ème} jour avant de décroître. Les taux de la souche STEC O157:H7 dans la pâte et la croûte ainsi que de la souche STEC O26:H11 dans la croûte ont chuté en dessous du seuil de dénombrement à partir du 210^{ème} jour. Le taux d'*E. coli* O26:H11 dans le cœur du fromage a décru plus lentement que dans la croûte. En effet, la souche était toujours dénombrable à un taux de 3 log₁₀ UFC.g⁻¹ dans cette partie du fromage au 240^{ème} jour. Le taux d'*E. coli* O26:H11 était significativement plus élevé que celui de *E. coli* O157:H7 à la fois dans la pâte ($p_{value} < 0,001$) et dans la croûte ($p_{value} = 0,0018$) tout au long de l'affinage.

3.2.b. Caractéristiques physico-chimiques

Quels que soient les STEC inoculés, le pH dans la pâte des fromages a chuté de 6,79 à 5,19 lors du premier jour de fabrication, puis il est remonté progressivement pour atteindre 5,52 au 240^{ème} jour (Figure 17). Dans la croûte des fromages, le pH a augmenté progressivement de 7,34 au 60^{ème} jour jusqu'à 7,64 au 240^{ème} jour. Les taux de lactate sont restés stables aux alentours de 1145 mg.100g⁻¹ (EC = 80 mg.100g⁻¹) au cours de l'affinage.

A coeur des fromages, l' a_w a diminué progressivement jusqu'à atteindre 0,943 (EC = 0,002) au 240^{ème} jour. Sur les croûtes, l' a_w a diminué de 0,941 (EC = 0,001) au 60^{ème} jour jusqu'à

0,922 (EC = 0,001) au 240^{ème} jour. Les températures ont varié en fonction des conditions décrites dans le matériel et méthodes (Figure 15).

3.3. Fromage de type Pâte Pressée Non-Cuite avec un Affinage Court (PPNC2-AR – lait de vache)

3.3.a. Comportement des STEC

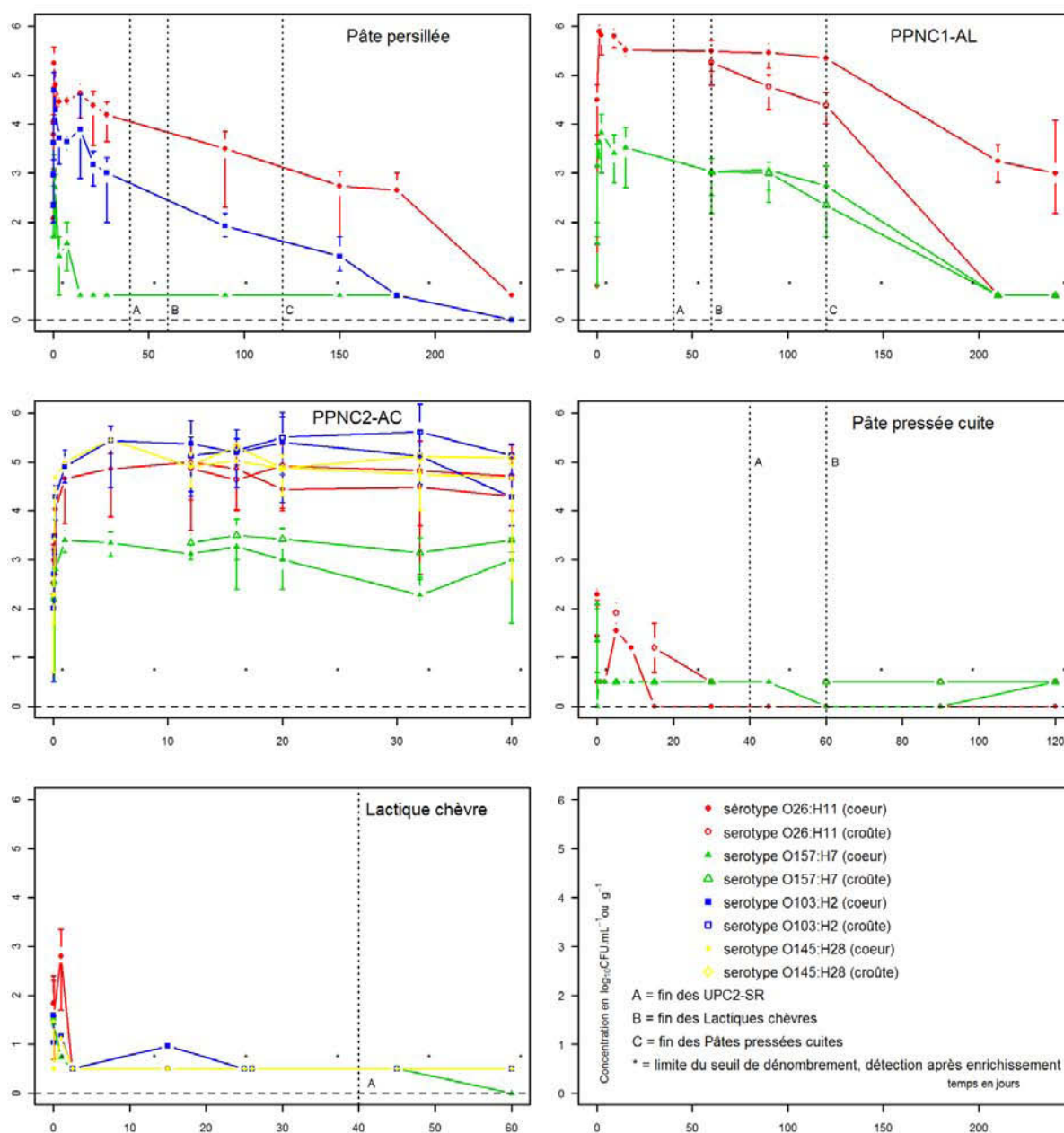
Trois souches appartenant au sérotype O26:H11, 2 souches au sérotype O103:H2, 1 souche au sérotype O145:H28 et 2 souches au sérotype O157:H7 ont été testées (n=3) pour cette technologie fromagère (Tableau 8).

Comme cela a été observé pour le fromage de type PPNC1-AL, les taux des souches testées ont augmenté lors des 24 premières heures de la fabrication du fromage (Figure 16). Les taux des souches *E. coli* O103:H2 et O145:H28 ont atteint $5 \log_{10}$ UFC.g⁻¹, tandis que ceux des 3 souches *E. coli* O26:H11 ont atteint des valeurs comprises entre 4 et $5 \log_{10}$ UFC.g⁻¹. Les taux des 2 souches *E. coli* O157:H7 ont atteint $3,3 \log_{10}$ UFC.g⁻¹.

Au cours de l'affinage, les taux de ces différentes souches sont restés constants. Il en a été de même au cours de la conservation des fromages jusqu'au 40^{ème} jour. Statistiquement, il n'a pas été noté de différence de comportement entre les souches appartenant à un même sérotype. De même, quel que soit le sérotype, il n'y a pas été observé de différence de comportement en fonction du type d'affinage que ce soit dans la pâte ou la croûte du fromage (p_{value} pâte and p_{value} croûte > 0.46). Quel que soit le type d'affinage, les taux des souches appartenant aux sérotypes O103:H2 et O145:H28 étaient significativement similaires dans la pâte (p_{value} (affinage traditionnel) = 0,915; p_{value} (affinage industriel) = 0,365) et la croûte (p_{value} (affinage traditionnel et industriel) = 0,43). Les taux de STEC O26:H11 et O145:H28 étaient significativement similaires dans la croûte (p_{value} (affinage traditionnel) = 0,22; p_{value} (affinage industriel) = 0,07).

Les taux des STEC O26:H11 étaient significativement plus bas que celui d'*E. coli* O145:H28 dans la pâte ainsi que de celui des STEC O103:H2 dans la pâte et la croûte (p_{value} < 0.05). Les taux des STEC O157:H7 ont été significativement plus bas que ceux des STEC O26:H11, O103:H2 et O145:H28 dans le cœur et la croûte du fromage (p_{value} < 0.05).

Figure 16. Moyennes des résultats de dénombrement des différents serotypes de STEC testés tout au long de la fabrication, de l'affinage et de la conservation des différents types de fromages. La fin des technologies plus courtes a été indiquée afin de visualiser plus distinctement l'impact de la durée d'affinage sur la survie des STEC. Les barres verticales représentent les valeurs minimales et maximales obtenues pour chaque sérotype lors des dénombrements.

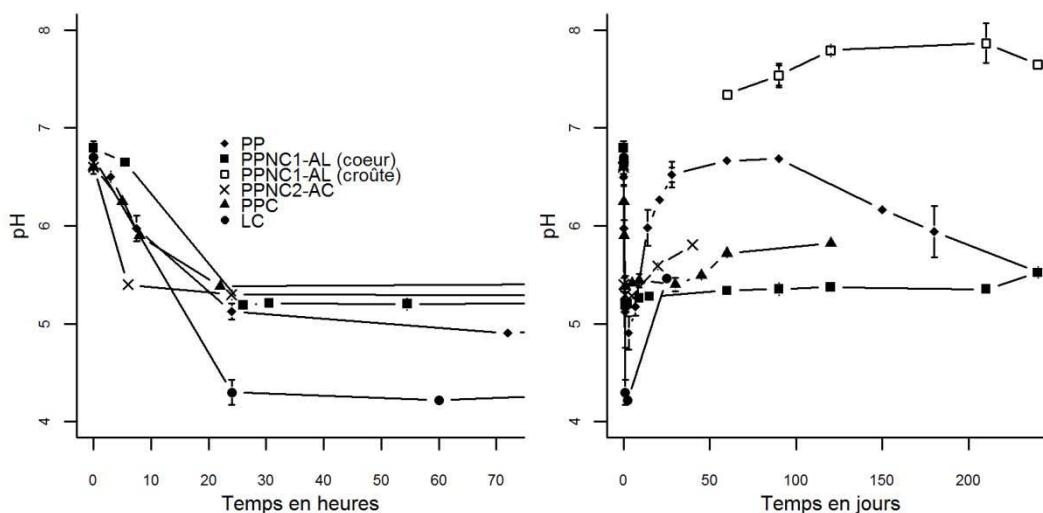


3.3.b. Caractéristiques physico-chimiques

Quels que soient les STEC inoculés, le pH dans la pâte du fromage a diminué de 6,6 jusqu'à 5,3 au cours du premier jour de fabrication. Il a ensuite augmenté progressivement après le 5^{ème} jour pour atteindre 5,8 au 40^{ème} jour (Figure 17). Les taux de lactate au 5^{ème} jour ont été de 996 mg.100g⁻¹ (EC= 152 mg.100 g⁻¹). Ils ont atteint 1109 mg.100 g⁻¹ (EC= 61 mg.100 g⁻¹) au 20^{ème} jour pour ensuite diminuer jusqu'à atteindre 649 mg.100 g⁻¹ (EC= 88 mg.100 g⁻¹) au 32^{ème} jour.

L'*a_w* est restée constante dans la pâte des fromages avec une valeur de 0,974 (EC = 0,0023) au 40^{ème} jour. Sur les croûtes, l'*a_w* est restée constante avec une valeur de 0,980 (EC = 0,0033) au 40^{ème} jour. Les températures ont varié en fonction des conditions décrites dans le matériel et méthodes (Figure 15).

Figure 17. Evolution des valeurs de pH (moyennes) au cours des premières de fabrication et au cours de l'affinage et de la conservation des fromages.



3.4. Fromage de type Pâte Pressée Cuite (PPC- lait cru de vache)

3.4.a. Comportement des STEC

Deux souches appartenant respectivement aux sérotypes O26:H11 et O157:H7 ont été testées en duplicata pour cette technologie fromagère (Tableau 8).

Au cours des premières heures de la fabrication, aucune augmentation des taux des STEC O26:H11 et O157:H7 n'a été observée (Figure 16). De plus, 1 h et 45 min après l'inoculation, les STEC n'ont été détectables qu'après enrichissement. Au cours de l'affinage, les souches n'ont pu être détectées qu'après enrichissement. Il n'a pas été observé d'effet sérotype pour cette technologie (p_{value} pâte = 0,249 et p_{value} croûte = 0,349). Dans la pâte du fromage au 120^{ème} jour, après enrichissement, la souche STEC O157:H7 n'a pu être isolée que pour une seule des deux répétitions tandis qu'aucune souche STEC O26:H11 n'a pu être isolée. Par contre, dans la croûte, au 120^{ème} jour, la souche STEC O26:H11 a pu être isolée après enrichissement pour les deux répétitions tandis que la souche STEC O157:H7 n'a pu être isolée que pour une seule des 2 répétitions.

3.4.b. Caractéristiques physico-chimiques

Quels que soient les STEC inoculés, au cours des premières heures de la fabrication des fromages, le pH a diminué de 6,6 à 5,38 dans la pâte et est resté stable environ un mois. Il a ensuite augmenté progressivement pour atteindre 5,82 au 120^{ème} jour (Figure 17). Les taux de lactate ont augmenté de 665 mg.100g⁻¹ (EC = 65 mg.100g⁻¹) 22 h après le début de la fabrication jusqu'à 1329 mg.100g⁻¹ (EC = 115 mg.100g⁻¹) au 45^{ème} jour, puis ils ont diminué jusqu'à atteindre 1034 mg.100g⁻¹ (EC = 64 mg.100g⁻¹) au 120^{ème} jour.

Dans la pâte du fromage, l' a_w est restée stable entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour pour ensuite diminuer jusqu'à atteindre 0,975 (EC = 0,0027) au 120^{ème} jour. Sur la croûte, l' a_w a augmenté de 0,974 (EC = 0,0035) à 0,980 (EC = 0,0025) entre le 15^{ème} et le 45^{ème} jour pour ensuite diminuer jusqu'à atteindre 0,964 (EC = 0,0038) au 120^{ème} jour. Les températures ont varié en fonction des conditions décrites dans le matériel et méthodes (Figure 15).

3.5. Fromage de type Lactique Chèvre (LC – lait de chèvre)

3.5.a. Comportement des STEC

Trois souches appartenant au sérotype O26:H11, 2 souches au sérotype O103:H2, 1 souche au sérotype O145:H28 et 2 souches au sérotype O157:H7 ont été testées (n=3) pour cette technologie fromagère (Tableau 8).

Au cours des premières heures de fabrication, les taux des STEC O103:H2, O145:H28 et O157:H7 sont restés identiques à ceux inoculés dans le lait (Figure 16). Seules les concentrations des 3 souches de sérotype O26:H11 ont augmenté de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$. Ces taux ont ensuite diminué après 24 heures (fin de l'étape de coagulation). Comme cela a été observé pour les technologies de type PP et PPNC1-AL, l'augmentation des souches de sérotype O26:H11 a été supérieure à celle des autres souches des autres sérotypes : p_{value} (O26:H11 vs O103:H2) = 0,0054; p_{value} (O26:H11 vs O157:H7) < 0,0001; p_{value} (O26:H11 vs O145:H28) = 0,0126. A l'inverse, il n'a pas été observé de différence significative de comportement entre les sérotypes O103:H2, O145:H28 et O157:H7. Le comportement des souches issues d'un même sérotype a été quant à lui statistiquement similaire. A la fin de l'étape de démoulage (60 h après l'inoculation des STEC), plus aucune souche n'a pu être dénombrée quel que soit le sérotype, mais elles ont pu être isolées après enrichissement. Au 60^{ème} jour, 4 souches (une appartenant au sérotype O26:H11 (souche 7501A), une appartenant au sérotype O103:H2 (souche F73120) et les 2 souches appartenant au sérotype O157:H7 n'ont plus été isolées même après enrichissement).

3.5.b. Caractéristiques physico-chimiques

Quels que soient les STEC inoculés, au cours des premières heures le pH a diminué de façon très importante, atteignant 4,21 au 2^{ème} jour de la fabrication. Il a ensuite augmenté pour atteindre 5,26 au 25^{ème} jour (Figure 17). Les taux de lactate ont diminué de 801 mg.100g^{-1} (EC = 46 mg.100g^{-1}) au 2^{ème} jour jusqu'à 343 mg.100g^{-1} (EC = 122 mg.100g^{-1}) au 25^{ème} jour.

L' a_w a diminué dans les pâtes des fromages de 0,994 (EC = 0,001) au 2^{ème} jour jusqu'à 0,967 (EC = 0,0038) au 45^{ème} jour. Les températures ont varié en fonction des conditions décrites dans le matériel et méthodes (Figure 15).

3.6. Recherche de la présence du gène *stx* en fin d'affinage pour les fromages de type Pâte Persillée

Une recherche de la présence du gène *stx* a été effectuée sur les souches de sérotype O26:H11, O103:H2 et O157:H7 aux points de prélèvement J90, J150, J180 et J240. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 9.

Toutes les souches isolées et testées à ces points possédaient le gène *stx*.

Tableau 9. Présence du gène *stx* sur les souches isolées en fin d'affinage et au cours de la conservation du fromage de type pâte persillée.

* : souches isolées après enrichissement, potentiellement issues du même clone bactérien.

NT : non-testé car aucune souche n'avait pu être isolée même après enrichissement.

Points de prélèvement	sérotype	Nombre de souches testées	Présence du gène <i>stx</i>
J90 (affinage)	O26:H11	70	+
	O103:H2	70	+
	O157:H7	10 *	+
J150 (fin d'affinage)	O26:H11	70	+
	O103:H2	70	+
	O157:H7	10 *	+
J180 (conservation)	O26:H11	70	+
	O103:H2	10 *	+
	O157:H7	10 *	+
J240 (fin de conservation)	O26:H11	10 *	+
	O103:H2	NT	NT
	O157:H7	NT	NT

4. Discussion

Au cours de cette étude, le devenir de 4 sérotypes de STEC différents a été étudié tout au long de la fabrication, de l'affinage et de la conservation de fromages au lait cru préparés selon 5 schémas technologiques différents. Le sérotype O157:H7, à l'heure actuelle est le plus étudié et les données montrent qu'il est le plus impliqué dans des épidémies liées à la consommation de fromage (Baylis, 2009; Farrokh *et al.*, 2012). Cependant, ce sérotype n'est pas le plus fréquemment retrouvé dans ce type de denrée. A notre connaissance, cette étude est la première destinée à déterminer le devenir et le comportement de souches STEC de sérotypes O26:H11, O103:H2 et O145:H28 tout au long de la fabrication et de l'affinage de fromages au lait cru de différentes espèces animales. De plus, le comportement de ces différents sérotypes a été comparé à celui de souches de sérotype O157:H7.

Les données obtenues ont montré un comportement différent des STEC d'un fromage à l'autre. Ceci était probablement lié à la grande variabilité des paramètres physico-chimiques et environnementaux (cinétique d'acidification, pH, température, a_w) des fromages fabriqués.

4.1. Facteurs inhibant la croissance des STEC

Les résultats de cette étude ont mis en exergue que 2 facteurs physico-chimiques pouvaient inhiber la croissance des STEC lors des premières heures de la fabrication.

Le premier de ces facteurs est l'acidification rapide et brutale qui caractérise les fromages de type lactique chèvre. Pour ces fromages, la phase de coagulation dure 24 heures, à 18 °C, avec une chute rapide du pH en dessous de 4,3. Or, il a été observé *in vitro* que *E. coli* ne peut pas croître à un tel pH (Glass *et al.*, 1992). Après cette étape, les STEC n'ont pu être isolés qu'après enrichissement des fromages. Des résultats similaires ont pu être observés précédemment (Vernozy-Rozand *et al.*, 2005b). En effet, Vernozy *et al.* (2005b) ont mis en évidence que des STEC O157:H7 inoculés à un taux de 10^2 UFC.mL⁻¹ dans du lait décroissaient au cours des 24 premières heures de la fabrication d'un fromage de type lactique chèvre (avec un pH = 4,3 à la fin de l'étape de coagulation). Ils ont également

montré qu'après le démoulage, les STEC n'étaient détectables qu'après enrichissement et ce, jusqu'à 42 jours après le début de la fabrication. Ces données sont en accord avec nos résultats.

Le second facteur ayant un impact négatif sur la croissance des STEC est la température. Le caillé des fromages de type pâte pressée cuite est chauffé 35 min à 54°C (une heure après l'inoculation des STEC et avant la phase de pressage) (Mahaut *et al.*, 2000). Après cette étape, les STEC étudiés n'ont pu être isolés qu'après enrichissement. Différentes études se sont intéressées à l'impact de la température sur *E. coli* O157:H7. Les résultats des temps de réduction décimale (valeur de D) varient en fonction de la température, de la souche mais aussi du type de matrice testée. Certains auteurs ont observé des valeurs de D de 31 min à 50 °C (ICMSF, 1996), de 11,51 min à 55 °C dans de la viande de dinde (Juneja & Marmar, 1999). D'autres auteurs ont observé une valeur de D comprise entre 2,14 et 8,32 min à 56°C dans du jus de pomme (Enache *et al.*, 2011) ou encore entre 0,95 et 4,98 min dans du lait à 58 °C (Hassan & Frank, 2000). Certains auteurs ont également mis en évidence qu'un chauffage à une température de 53 °C entraînait une diminution efficace du taux de STEC en début de fabrication fromagère permettant ainsi d'assainir ce type de fromage (Peng *et al.*, 2011). Dans notre étude, au cours de l'affinage, les STEC n'ont pu être isolés qu'après enrichissement. Certains auteurs ont observé que des souches d'*E. coli* étaient inactivées après 180 min de chauffage à 55 °C (Usajewicz & Nalepa, 2006). Or, ces souches, bien que stressées et endommagées, pouvaient « récupérer » de leurs stress et croître si elles étaient incubées à leur température optimale de croissance, soit 37 °C. Ces mêmes auteurs ont par contre observé qu'une conservation à 7 °C inhibait la régénération et la reprise de croissance de ces bactéries stressées. Or, les fromages de types PPC de cette étude ont été affinés à une température de 9 °C. Cette température pourrait expliquer l'incapacité des souches STEC survivantes à croître après l'étape de chauffage.

4.2. Facteurs permettant une augmentation du taux de STEC

Une augmentation du taux de STEC a été observée pour 3 technologies : la pâte persillée et les 2 pâtes pressées non-cuites. Cette augmentation peut résulter de 2 phénomènes. Le

premier est le phénomène de concentration dans le caillé concomitamment à l'expulsion du lactosérum. Cette étape entraîne une concentration des bactéries présentes d'un facteur 5 pour les PP à un facteur 10 pour les PPNCs dans le caillé (Govaris *et al.*, 2002 ; Reitsma & Henning, 1996 ; données personnelles). Le second phénomène est une multiplication des souches de STEC. En effet, l'augmentation de plusieurs \log_{10} UFC.g⁻¹ des taux des STEC observée pour ces 3 types de fromage indique clairement qu'il y a eu multiplication de ces bactéries. Lors des premières étapes de la fabrication des pâtes persillées et des pâtes pressées non-cuites les conditions ont été favorables à la croissance des STEC. La température a été supérieure à 30 °C et l'acidification modérée qui caractérise ces technologies fromagère ne peut, au pire, que ralentir le développement des STEC. En effet, pour ces technologies, le pH n'a pas chuté en dessous de 4,9 lors des 24 premières heures de la fabrication or il a été démontré qu'*E. coli* O157:H7 peut croître dans une gamme de pH comprise entre 4,5 et 9 (Glass *et al.*, 1992). De plus, le phénomène d'augmentation du taux de STEC en début de fabrication a déjà été observé pour un cocktail de souches *E. coli* O157:H7 artificiellement inoculées dans du lait au cours de la fabrication de Cheddar (Schlesser *et al.*, 2006). Ces auteurs ont observé une augmentation de 1 à 2 \log_{10} UFC.g⁻¹ du taux des STEC lors des premières heures de fabrication.

4.3. Facteurs permettant une diminution du taux de STEC au cours de l'affinage

La durée de l'affinage a un impact sur la survie des STEC notamment suite à la diminution de l' a_w (Mahaut *et al.*, 2000). L' a_w minimale pour la croissance de *E. coli* est de 0,95 (Sperber, 1983) et il a été démontré qu'une a_w de 0,92 était suffisante pour permettre une diminution du taux de STEC dans des tranches de fromage (Glass *et al.*, 1998). Les analyses physico-chimiques mises en œuvre sur les fromages ont montré que l' a_w la plus faible au cours de l'affinage a été observée pour les fromages de type pâte persillée. Celle-ci chute en dessous de 0,9 au bout de 240 jours. De plus, ces fromages ont été conservés à une température de -2 °C entre les jours 28 et 90. Les STEC sont connus pour résister au froid (Møretrø *et al.*, 2010), mais l'hypothèse peut être émise qu'un effet synergique de la baisse de l' a_w combinée à une température négative et à un pH acide ait pu entraîner une diminution du

taux des STEC. Dans le cas de la pâte pressée non-cuite à affinage long, la diminution de l' a_w au cours de l'affinage pourrait être un des facteurs expliquant la diminution des taux de STEC observée après 90 jours. Par ailleurs, l' a_w dans la croûte de ce type de fromage a chuté plus vite que celle de la pâte alors même que son pH s'était maintenu à des valeurs plus élevées (environ 7,7). Ceci pourrait expliquer pourquoi le taux de STEC O26:H11 a diminué plus rapidement dans la croûte que dans la pâte de ce fromage. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Schlessner *et al.* (Schlessner *et al.*, 2006). En effet, ces derniers avaient mis en évidence que le taux de souches d'*E. coli* O157:H7 dans la pâte des fromages placés à 7 °C âgés de 60 et 120 jours avaient diminué respectivement d'un peu moins de 1 et 2 \log_{10} UFC.g⁻¹. De même, D'Amico *et al.* (2010) ont observé que des STEC O157:H7 artificiellement inoculés dans des fromages de type Cheddar et Gouda pouvaient encore être détectables au bout de 270 jours après enrichissement. Les résultats obtenus au cours de nos travaux sont en accord avec ces 2 études. Nos données confirment qu'un affinage de plus de 60 jours est efficace pour entraîner une diminution du taux de STEC sans toutefois permettre de les éliminer totalement.

A l'inverse, un affinage court ne permet pas une réduction suffisante de l' a_w . Ceci est le cas du fromage de type pâte pressée non-cuite avec affinage court. Pour ce type de fromage, aucune diminution du taux de STEC n'a été observée que ce soit pendant l'affinage ou la conservation du fromage. Cette phase stationnaire a déjà été décrite dans la littérature. Ramsaran *et al.* (1998) ont observé que des souches de *E. coli* O157:H7 inoculées à 4 \log_{10} UFC.mL⁻¹ dans du lait cru de vache survivaient à plus de 6 \log_{10} UFC.g⁻¹ jusqu'à 75 jours (fin de la période de conservation du fromage testé).

La survie des STEC au cours de l'affinage et de la conservation au froid du fromage peut donc être impactée par une combinaison de plusieurs facteurs comme la durée, le pH, l' a_w , la température mais aussi par des phénomènes de compétitions avec les microflores présentes dans les fromages (production d'antimicrobiens, compétition nutritive). En effet, il a été démontré que plusieurs « barrières » sont plus efficaces qu'une seule (Erickson & Doyle, 2007).

4.4. Effet sérotype

Statistiquement, aucun effet souche pour un même sérotype n'a été mis en évidence pour les fromages de type « lactique chèvre » et de type « pâte pressée non-cuite avec affinage court ». Néanmoins, peu de souches différentes appartenant à un même sérotype ont été utilisées. Cette absence d'effet souche avait déjà été mise en évidence par D'Amico *et al.* (2010) : les 3 souches de sérotypes O157:H7 qu'ils avaient inoculé artificiellement dans un fromage de type « Cheddar » avaient eu un comportement identique. Cependant, nos travaux ont révélé un effet sérotype pour les fromages de type pâte persillée et les 2 pâtes pressées non-cuites : les souches de sérotype O157:H7 ont connu une croissance plus faible que les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2 et O145:H28.

Il est donc possible que les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2 et O145:H28 soient de meilleures compétitrices que les souches appartenant au sérotype O157:H7. Il est important de souligner qu'*E. coli* O157:H7 a connu, au cours de son évolution, de nombreuses mutations qui lui ont fait perdre notamment la capacité de fermenter le sorbitol ou encore l'activité de la β -glucuronidase (Monday *et al.*, 2001). Ces mutations ainsi que d'autres phénomènes, pourraient avoir eu un impact sur le devenir de ce sérotype au cours de la fabrication fromagère. De plus, le gène *stx* est porté par un phage de type lambdaïde. L'activation du cycle lytique de ce prophage est induite par différents stress (Imamovic & Muniesa, 2012 ; Schmidt, 2001). L'hypothèse suivante peut être émise : les souches de sérotype O157:H7 pourraient être plus sensibles aux différents stress rencontrés lors de la fabrication fromagère que les souches des autres sérotypes testés. Par conséquent, l'activation du cycle lytique du prophage lambdaïde pourrait provoquer une forte diminution de la population d'*E. coli* O157:H7 dans le fromage. Des études complémentaires devront être menées afin de confirmer le comportement observé des *E. coli* O157:H7 en testant d'autres souches appartenant à ce sérotype, ainsi que de tester des souches *E. coli* O157:NM capables de fermenter le sorbitol.

4.5. Présence du gène *stx* en fin d'affinage

De plus, la recherche de la présence du gène *stx* sur les fromages de type pâte persillée en fin d'affinage a révélé que toutes les souches testées possédaient toujours le gène *stx*. Ainsi, malgré les stress liés à la survie dans ce type de fromage, les souches STEC testées et notamment celle de sérotype O26:H11 n'ont pas perdu leur gène *stx* comme cela avait déjà été constaté (Bielaszewska *et al.*, 2007). Ces souches restent donc potentiellement pathogènes.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude a mis en évidence qu'un chauffage du caillé dans le fromage de type « pâte pressée cuite » ou qu'une acidification brutale et rapide dans le fromage de type « lactique chèvre » ont permis un assainissement efficace des STEC. A l'inverse, des températures et des pH modérés ont autorisé une augmentation du nombre de ces bactéries comme cela a été observé pour les fromages de type pâte persillée et les 2 pâtes pressées non-cuites (même si les taux de croissance observés ont été différents en fonction des technologies). Dans ce cas, seul un affinage long a pu permettre une diminution du taux des STEC.

Dans le cas des fromages de type pâte persillée et pâte pressée non-cuite avec un affinage long, de nombreuses souches ont pu être isolées après enrichissement même après plusieurs mois d'affinage. Mais il est important de souligner que les STEC ont été inoculés dans le lait à des taux élevés avoisinant 10^2 UFC.mL⁻¹. Ce taux élevé, ne reflétant pas le taux de contamination naturel des laits, a pu impacter la survie de ces bactéries. De nouvelles expérimentations avec des taux de contamination proches des taux de contamination naturelle seront envisagées. De plus, l'état physiologique des souches utilisées en challenge test diffère de celui des souches naturellement présentes dans le lait, ce qui a aussi pu impacter leur comportement.

Les résultats obtenus serviront de base à un travail de modélisation (Schvartzman *et al.*, 2011) pour évaluer la concentration finale des STEC dans le fromage dans des conditions plus réalistes de contamination du lait par ces bactéries.

S'il est confirmé que la croissance des souches appartenant au sérotypes O157:H7 est plus faible que pour les autres sérotypes, alors il sera intéressant d'étudier l'état physiologique de celles-ci (stress, induction du prophage lambdaïd...). Les données concernant les interactions des STEC avec la microflore annexe disponibles à ce jour sont contradictoires, certains auteurs estimant que ces microflores jouent un rôle antagoniste vis-à-vis des STEC (Duffy *et al.*, 1999) tandis que d'autres estiment que ces microflores n'ont aucun impact sur les STEC (Masoud *et al.*, 2012). Une étude a également montré que certaines moisissures tel que *Penicillium roqueforti* peuvent favoriser la croissance de *E. coli* O157:H7 *in vitro* (Lee *et al.*, 2012). Ainsi, il sera aussi nécessaire d'étudier l'impact de la microflore naturelle du lait cru ainsi que des ferments utilisés et des moisissures sur le comportement des STEC. En ce qui concerne la présence du gène *stx*, l'étude a été limitée à une seule technologie fromagère, de nouvelles expérimentations devront être menées sur des souches ayant résisté à d'autres technologies fromagères. Des souches supplémentaires devront également être employées. De plus, la présence du gène n'impliquant pas nécessairement leur transcription ou la traduction de son ARNm, des travaux devront être réalisés afin d'étudier l'expression du gène *stx* pour les souches ayant survécu à la fabrication d'un fromage.

6. Valorisation

6.1. Publication

Ces travaux sur la croissance et la survie des STEC au cours de la fabrication et de l'affinage de différentes technologies fromagères au lait cru ont été publiés dans la revue à comité de lecture Applied and Environmental Microbiology. Cette publication est disponible en Annexe 5 :

Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses.

Miszczycha SD, Perrin F, Ganet S, Jamet E, Tenenhaus-Aziza F, Montel MC, Thevenot-Sergentet D.

Applied and Environmental Microbiology. 2013. Jan 79 (1) :150-8.

6.2. Communications orales

Ces travaux ont fait l'objet de 2 communications orales présentées en Annexe 6 :

+ Une présentation orale à la journée thématique sur les STEC organisée par le CNIEL à Paris a été faite en Novembre 2011 :

« Etude de la croissance, de la survie et de la pathogenicite des STEC dans les technologies fromageres au lait cru. »

Miszczycha S.D. ; Perrin F. ; Ganet S. ; Jamet E. ; Tenenhaus-Aziza F. ; Farrokh C. ; Montel M-C. ; Thevenot-Sergentet D.

+ J'ai de plus effectué une communication orale dans le cadre de la journée des doctorants organisée par VetAgro-Sup en mai 2012 : « Etude de la croissance et de la survie des STEC dans les technologies fromagères au lait cru »

6.3. Posters

Ces travaux ont fait l'objet de 2 posters présentés dans les Annexe 7 et 8 :

+ Présentation d'un poster au séminaire international : « Microbiological safety of UK raw milk cheeses » au Campden BRI le 08 Mars 2011 (Chipping Campden, UK.) :

« Growth, Survey and Pathogenicity of the STEC in French Raw Milk Cheeses. »

S. D. Miszczycha, S. Ganet, E. Jamet, C. Farrokh, M.C. Montel and D. Thevenot-Sergentet.

Ce même poster a été présenté en Avril 2011 aux journées de l'école Doctorale de Clermont-Ferrand.

+ Présentation d'un poster au séminaire international VTEC 2012 à Amsterdam en mai 2012 :

« Growth, Survival and Pathogenicity of the STEC in French Raw Milk Cheeses. »

S. D. Miszczycha, F. Perrin, S. Ganet, F. Tenenhaus-Aziza, E. Jamet, C. Farrokh, M.C. Montel and D. Thevenot-Sergentet.

Avant propos.

Les Français sont parmi les premiers consommateurs au monde de fromages. Les fromages au lait cru s'inscrivent dans une dynamique de développement rural et d'aménagement du territoire, leur production évite la désertification de certaines zones en fournissant une source de revenus non-négligeable aux agriculteurs. Ils sont souvent produits sous signe de qualité (appellation d'origine protégée). Une crise alimentaire majeure pourrait mettre ce marché de tradition en péril. Par conséquent, la maîtrise des STEC tout au long de la chaîne de production et une meilleure connaissance de sa pathogénicité sont des enjeux majeurs tant du point de vue de la santé publique que du maintien d'une activité économique dans des zones défavorisées.

Différentes études et plans de surveillance menés sur le territoire français ont montré la présence de souches de STEC dans certains fromages. Pourtant, un nombre limité de cas de SHU et d'épidémies impliquant des fromages ont été recensés. Ce constat soulève donc des interrogations quant à la pathogénicité des souches issues des fromages :

- Les STEC peuvent survivre à la fabrication de certains fromages, mais sont ils capables de survivre à la digestion ?

- Les travaux concernant le comportement des STEC au cours de la digestion ont été focalisés sur le sérotype O157:H7, mais comment se comporterait une souche d'un autre sérotype ?

CHAPITRE 4. Etude du comportement de souches STEC appartenant au sérotype O26:H11 et au sérotype O157:H7 ayant survécu au processus de fabrication fromager au cours d'une digestion artificielle.

1. Introduction

Au cours de la première partie de ce mémoire expérimental, il a été observé que des souches STEC de sérotypes O26:H11 et O157:H7 artificiellement inoculées dans du lait cru pouvaient survivre au processus de fabrication de certains fromages (pâtes pressées non-cuites). Mais pour être à même de provoquer des pathologies chez l'être humain, les STEC doivent être capables de survivre au passage dans l'estomac ainsi que dans les différents compartiments du petit intestin. Lors de précédent travaux, Etienne-Mesmin *et al.* (2011) ont étudié la survie de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 artificiellement inoculée dans du steak haché au cours de la digestion à l'aide d'un digesteur artificiel, le *TNO* gastro-Intestinal Models (TIM). Les auteurs ont démontré que cette souche pouvait survivre au cours de la digestion artificielle. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée au comportement de souches STEC issues de produits laitiers au cours de la digestion.

Il a donc paru intéressant d'étudier le comportement de souches STEC ayant survécu à la fabrication d'un fromage au cours de la digestion et d'observer l'expression du gène *stx* des souches STEC en sortie du TIM afin de pouvoir mieux comprendre cet écart entre la prévalence des STEC dans les fromages et leur implication dans des épidémies. Plus précisément, l'objectif de ce travail a été d'étudier le devenir de souches STEC ainsi que des populations microbiennes naturellement présentes dans un fromage lors de leur passage dans un digesteur artificiel mimant les conditions physico-chimiques de la digestion. Pour cela, deux souches STEC appartenant aux sérotypes O26:H11 et O157:H7 ont préalablement été inoculées dans des laits crus avec lesquels des fromages de type pâte pressée non-cuite à affinage court (PPNC) ont été fabriqués. Ces fromages ont ensuite été digérés par le TIM. La survie des différentes flores (STEC ainsi que des flores fromagères) a ainsi pu être étudiée dans des conditions simulant le tractus digestif humain.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes

Deux souches différentes de STEC appartenant à la collection du laboratoire et testées dans la première partie du mémoire expérimental ont été utilisées lors de ces expérimentations : une souche appartenant au sérotype O26:H11 (souche F15338) et une souche appartenant au sérotype O157:H7 (souche 721.4) (Tableau 10). Les souches employées ont toutes été isolées à partir de produits laitiers et possèdent les gènes de virulences *eae* et *stx1* ou *stx2*. La présence des principaux gènes impliqués dans l'acido-résistance (*rpoS*, *gadA/B*, *gadC* et *gadE*) a été testée chez ces souches par PCR selon les protocoles décrits par Ma *et al.* (2003) ainsi que par Takada *et al.* (2007). De plus, la capacité de survivre en milieu très acide a été testée pour ces deux souches par le test nommé GAD assay décrit par Rice *et al.* (1993) et modifié par Takada *et al.* (2007). Ce test permet d'évaluer les performances du système de résistance à l'acidité dépendant du glutamate (système GAD) décrit précédemment dans le mémoire bibliographique. La décarboxylation du glutamate par la glutamate décarboxylase

entraîne la consommation de protons induisant ainsi une alcalinisation du milieu. Cette alcalinisation modifie alors la couleur du milieu qui vire du jaune au vert. Toutes les souches ont été conservées à l'aide de cryo-billes (AEB 400100, laboratoire AES, Combourg, France) à -80 °C.

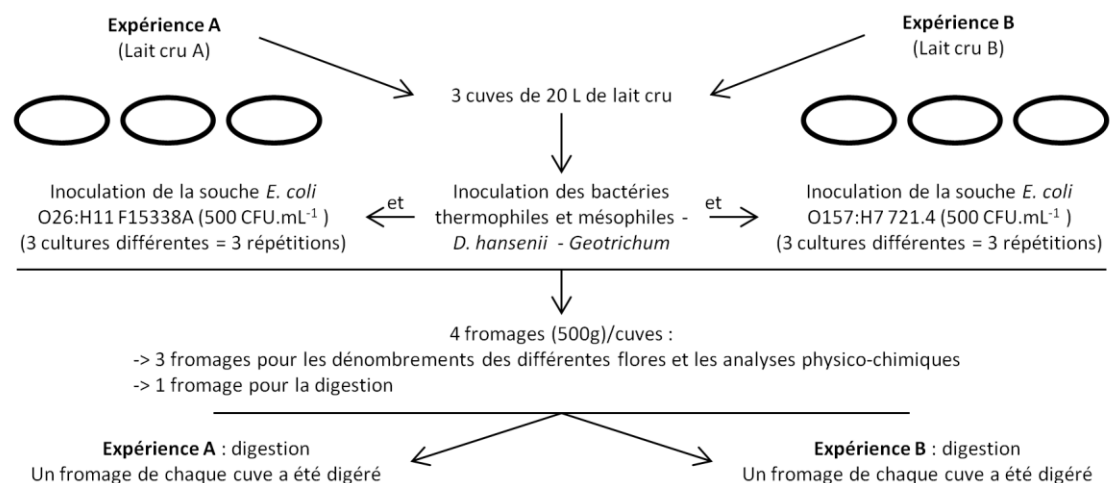
Tableau 10. Souches utilisées au cours de l'expérimentation digesteur.

Nom (origine)	Sérotype	Gène de virulence	Gène <i>ropS</i> ⁵	Gène <i>gadA/B</i> ⁵	Gène <i>gadC</i> ⁵	Gène <i>gadE</i> ⁶	GAD assay: couleur après 4 heures
F15338* (fromage lait cru de vache)	O26 ¹ :H11 ³	<i>eae</i> ² <i>stx1</i> ¹	X	X	X	X	Verte
721.4* (lait de brebis)	O157:H7 ⁴	<i>eae</i> ² <i>stx2</i> ¹	X	X	X	X	jaune/verte

* Toutes les souches sont issues de la collection du Laboratoire National de Référence des STEC français.

¹ Perelle *et al.*, 2004 ; ² Nielsen *et al.*, 2003 ; ³ Madic *et al.*, 2010 ; ⁴ Mischzycha *et al.*, 2012 ; ⁵ Takada *et al.*, 2007 ; ⁶ Ma *et al.*, 2006

Figure 18. Diagramme présentant les 2 séries d'expériences réalisées lors de l'expérimentation digesteur.



2.2. Inoculation

Les souches ont été revivifiées dans du bouillon cœur-cervelle (BHI, bioMérieux) à 37°C pendant 24 h. Puis, 100 µL de la culture bactérienne ont été ajoutés à 10 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT, bioMérieux). Les suspensions ont ensuite été incubées 24 h à 37 °C, puis placées pendant 48 h à 8°C afin de mimer les conditions de stockage du lait et d'obtenir des souches adaptées au froid. Les concentrations des souches ont été évaluées par mesure de la DO à 550 nm. Puis, les suspensions bactériennes ont été diluées de façon à inoculer le lait cru avant l'étape d'emprésurage à un taux de 500 UFC.mL⁻¹. En parallèle, un dénombrement a été effectué sur des géloses de types PCA (Plate Count Agar, bioMérieux) afin de contrôler la concentration de l'inoculum. Les géloses ont été incubées 24 h à 37 °C.

Toutes les souches ont été inoculées de façon individuelle dans le lait avant la phase d'emprésurage et en triplicata.

2.3. Fabrication des fromages

Tous les fromages ont été fabriqués à l'Unité de Recherches Fromagères (URF) de l'INRA à Aurillac. Le type de fromage choisi pour ces expérimentations était un fromage de type « pâte pressée non cuite à affinage court et traditionnel fabriqué à partir de lait cru de vache » (cf chapitre 3). Cette technologie avait été retenue car notre étude précédente avait montré qu'elle favorise une croissance des STEC pendant les premières heures de fabrication puis elle permet une stabilisation de celle-ci tout au long de l'affinage et de la conservation du fromage (Miszczycha *et al.*, 2013).

Deux séries d'expérimentations ont été réalisées : une avec l'inoculation artificielle de la souche STEC O26:H11 F15338 (expérience A) et une avec la souche STEC O157:H7 721.4 (expérience B). Ces deux fabrications ont été réalisées à deux semaines d'intervalles afin de pouvoir coordonner les digestions artificielles (seules deux digestions à l'aide du TIM pouvaient être réalisées par semaine) (Figure 18).

Ainsi, 2 mélanges de lait cru ont été collectés chez des producteurs locaux des environs d'Aurillac avant d'être acheminés à froid à l'URF. Chaque mélange de lait a ensuite été divisé

dans 3 cuves (20 L de lait par cuve) et chauffé à 34 °C. Dans chacune des cuves, le lait a été complémenté en CaCl₂ (3 mL / 100 L), de la souche STEC testée (500 UFC.mL⁻¹) ainsi que de ferments : ferments thermophiles Y 502 (200 g / 20 L) et mésophiles SIR (20 g / 20 L), une souche de *D. hansenii* (0,3 mL / 20 L) et des *Geotrichum*. La présure a été ajoutée à un taux de 30 mL / 100 L. Au total, 4 fromages de 500 g par cuve ont été fabriqués. Pour chaque fabrication, les sérotypes O26:H11 et O157:H7 ont été recherchés afin de s'assurer que les laits utilisés n'étaient pas naturellement contaminés par des STEC.

2.4. Digestion artificielle par le TIM

Toutes les digestions artificielles ont été réalisées à l'ERT CIDAM (Conception Ingénierie Développement Aliment Médicament) à Clermont-Ferrand. Le système gastro-intestinal TIM (TNO, Zeist, Pays-Bas) est constitué de 4 compartiments simulant les conditions stomacales ainsi que celles des 3 compartiments formant l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) (Blanquet-Diot *et al.*, 2012 ; Minekus *et al.*, 1995).

Chaque compartiment est composé d'un tube de verre à l'intérieur duquel est placée une membrane souple. Le mouvement péristaltique et la température à l'intérieur des différents compartiments sont maintenus par un flux d'eau régulier à 37 °C entre la paroi en verre et la membrane souple. Le transit du chyme est quant à lui contrôlé par informatique (Elashoff *et al.*, 1982). Il est régulé dans le TIM par des valves péristaltiques qui connectent les différents compartiments. Le volume de chaque compartiment est contrôlé par des capteurs de pression et le pH est contrôlé et ajusté (ajout de HCl ou NaHCO₃) par informatique. Les sécrétions gastriques, biliaires et pancréatiques artificielles sont introduites dans les compartiments par des pompes contrôlées par informatique. L'eau et les produits de digestion sont quant à eux évacués du jéjunum et de l'iléon par dialyse à travers des membranes de fibres creuses (SF 90G, Nipro, Belgique). Avant chaque expérimentation le système est lavé à l'aide de détergents, rincé à l'eau et stérilisé par autoclavage (105 °C pendant 45 min).

Le TIM a été programmé afin de mimer les conditions physico-chimiques de digestion d'un aliment solide chez un individu adulte en bonne santé. Un total de 300 mL de la mixture a été introduit dans le TIM lors de ces expérimentations. Cette mixture était constituée d'un

mélange équivalent d'eau minérale (175 mL) (Volvic, France) et de fromage préparé avec du lait artificiellement inoculé par les STEC (175 g). Les fromages ont été digérés après affinage, lors de leur conservation (entre J23 et J35). Le mélange eau et fromage a été homogénéisé à l'aide d'un système Ultra Turrax (T25, IKA-Werke, Allemagne) à 24000 rpm. La mixture a été préparée extemporanément et digérée dans le TIM pendant 360 min. Deux séries de digestions ont été réalisées en triplicata, une première avec les fromages dont le lait avait été artificiellement inoculé avec la souche STEC O26:H11 F15338 et une seconde avec les fromages dont le lait avait été artificiellement inoculé avec la souche STEC O157:H7 721.4. Afin de mesurer la survie des différents micro-organismes au cours de ces digestions artificielles, les expérimentations ont toutes été réalisées de manière identique avec l'ajout à 0,8 % (w/v) dans l'eau d'un marqueur non-absorbable et soluble dans l'eau, le bleu dextran (Minekus *et al.*, 1995).

2.5. Analyse du bleu dextran

Le bleu dextran a été utilisé comme marqueur de transit. Sa concentration a été déterminée tout au long de la digestion par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre (DU 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter, France) à une longueur d'onde de 595 nm.

2.6. Echantillonnage

2.6.a. Dans le fromage

Des échantillons (50 mL ou g) ont été prélevés dans le lait et le fromage tout au long de la fabrication, de l'affinage et de la conservation des fromages (lait avant emprésurage, lait pendant emprésurage, caille au moulage, J1, J7, J14 et J21). Les points de prélèvements ont été choisis en accord avec les technologues fromagers à des étapes qui pouvaient avoir un impact sur le comportement des STEC.

2.6.b. Dans le TIM

Pour chaque série de digestion, un échantillon (20mL) a été prélevé dans la mixture (eau + fromage) avant son introduction dans le TIM pour le dénombrement des STEC et des populations microbiennes des fromages. Ensuite, les échantillons (2 mL) ont été collectés régulièrement dans tous les compartiments (estomac, duodénum, jéjunum et iléon) au cours de la digestion pour le dénombrement des STEC. Les sorties iléales ont-elles été conservées dans de la glace, accumulées entre 0-60, 60-120, 120-180, 240-300 et 300-360 minutes pour le dénombrement des STEC et des principaux groupes microbiens du fromage (Tableau 11).

2.7. Dénombrement et détection des STEC

2.7.a. Dans le fromage

Les prises d'essais ont été de 50 mL pour le lait et de 50 g pour les fromages. Les échantillons ont été dilués au 1/5 dans de l'EPT puis homogénéisés pendant 60 s à l'aide d'un stomacher (AES). Les suspensions ont ensuite été diluées au 1/10 dans à l'aide de bouillon tryptone-sel (TS, bioMérieux) et étalées sur des géloses spécifiques.

Pour le dénombrement des souches *E. coli* O157:H7, 100 µL de la suspension ont été étalés sur des géloses de type O157:H7 ID (bioMérieux) complémentées de 0,05 mg.L⁻¹ de céfixime et de 2,5 mg.L⁻¹ de tellurite afin de limiter la croissance des autres flores microbiennes.

Pour le dénombrement des souches *E. coli* O26:H11, 100 µL des suspensions ont été étalés sur des géloses de type *E. coli* ID (bioMérieux) ainsi que la gélose sélective décrite par Possé *et al.* en 2008.

Tous les dénombrements ont été effectués en triplicata. Les géloses ont été incubées 24 h à 37 °C et le sérotype des souches isolées a été confirmé par PCR en temps réel comme décrit plus loin.

Lorsqu'aucune souche ne pouvait être dénombrée, un enrichissement a été mis en œuvre. Cette étape a permis de déterminer si la bactérie recherchée était présente ou non dans l'échantillon. Pour cela, le reste de la suspension (échantillon + EPT) qui n'avait pas été utilisé pour le dénombrement a été complémenté d'acriflavine (inhibition de la croissance de la flore annexe) puis incubé 24 h à 41,5 °C (Savoye *et al.*, 2011).

Tableau 11. Points de prélèvements : TIM.

Prélèvement	T0	Points de prélèvement dans l'estomac					Points de prélèvement dans le duodénum					Points de prélèvement dans le jéjunum					
		30	60	90	120	150	30	60	120	180	240	60	120	180	240	300	360
Temps en min	0	30	60	90	120	150	30	60	120	180	240	60	120	180	240	300	360
STEC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Groupes microbiens	X																

TABLEAU - suite

Prélèvement	Points de prélèvement dans l'iléon						Accumulation des sorties iléales					
	60	120	180	240	300	360	0-60	60-120	120-180	180-240	240-300	300-360
Temps en min	60	120	180	240	300	360	0-60	60-120	120-180	180-240	240-300	300-360
STEC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Groupes microbiens							X	X	X	X	X	X

Les souches ont alors été immuno-séparées du bouillon d'enrichissement à l'aide de billes magnétiques (technique de séparation immunomagnétique ou IMS) sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques des sérogroupes recherchés : des Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La suspension contenant les billes magnétiques obtenues après IMS a ensuite été étalée sur des géloses spécifiques comme décrit précédemment. En parallèle, un étalement direct du bouillon d'enrichissement a également été effectué sur ces mêmes géloses. Le sérotype des souches isolées a été confirmé par PCR en temps réel.

2.7.b. Dans le TIM

Le protocole de dénombrement/détection a été le même que pour les fromages à l'exception que la prise d'essai était de 1 mL et qu'elle a été diluée au 1/10 dans 9 mL d'EPT. Les dilutions décimales suivantes ont été réalisées dans du TS.

Le restant de la première dilution a été incubé 18 à 24 h à 41,5 °C en tant qu'enrichissement afin de détecter les STEC encore présents mais qui n'avaient pas pu être dénombrés.

2.8. Confirmation et caractérisation des bactéries par PCR en temps réel

L'ADN bactérien a été extrait par ébullition (15 min) d'une colonie dans 250 µL d'eau DNA/DNAse free (Qiagen). Puis, l'échantillon a été centrifugé 3 min à 13 000g. Le surnageant contenant l'ADN a ensuite été conservé à -20 °C.

La recherche des gènes de virulence *eae* et *stx1* et/ou 2 a été effectuée selon les protocoles décrits par, respectivement, Nielsen *et al.* (2003) et Perelle *et al.* (2004). La détermination du sérotype O26 a été effectuée selon le protocole décrit par Perelle *et al.* (2004). La détermination du flagelle H11 a été réalisée selon le protocole décrit par Madic *et al.* (2010) et l'identification d'*E. coli* O157:H7 a été effectuée selon le protocole décrit par Mischzycha *et al.* (2012).

Chaque réaction de PCR (30 µL) était composée de : 1X de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), amorces et sondes aux concentrations décrites par les auteurs

précédemment cités, 1X d'IPC (Internal Positive Control) Mix et ADN (Applied Biosystems), de l'eau DNA/DNAse free (Qiagen) et de 3 µL de la suspension d'ADN.

Les réactions de PCR en temps réel ont été effectuées à l'aide d'un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems).

2.9. Analyses microbiologiques

2.9.a. Dans le fromage

Les échantillons de lait et de fromage ont été dilués dans un tampon phosphate (2 % wt/vol) et broyés et homogénéisés à l'aide d'un Stomacher Lab Blender (Seward Medical, London, UK) pendant 4 min. Les dénombrements ont été effectués en duplicata.

Les populations de bactéries mésophiles et thermophiles ont été dénombrées sur des géloses de type M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) et incubées soit à 30 °C, soit à 42 °C. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ont été dénombrés sur des géloses FH (Isolini *et al.*, 1990) et incubés 48 h à 37°C. Les leuconostocs producteurs de dextrans ont été dénombrés sur des géloses de type Mayeux-Sandine-Elliker (MSE) (Mayeux *et al.*, 1962) et incubés 48 h à 30 °C. Les entérocoques ont été dénombrés des géloses SB (Slanetz & Bartley, 1957) et incubés 48 h à 42 °C. Les bactéries à Gram-positives catalases positives (bactéries d'affinage) ont été dénombrées sur des géloses CRBM (Denis *et al.*, 2001) et incubées 5 à 10 jours à 25°C. Les lactocoques ont été dénombrés sur des géloses Turner Sandine Elliker (Turner *et al.*, 1963) additionnées d'acide nalidixique. Les bactéries Gram-négatives ont été dénombrées sur des géloses PCA (Standard 100B; FIL-IDF, 1991) additionnées de 1% de lait, de 5 mg/l de vancomycine et de 5 mg/l de crystal violet. Ces géloses ont été incubées 48 h à 30 °C. Les levures et les moisissures ont été dénombrées sur des géloses Oxytetracycline Glucose Agar (OGA) (Mossel *et al.*, 1975) et incubées 3 à 5 jours à 25 °C. Toutes les géloses proviennent de chez Biokar Diagnostics (Pantin, France).

2.9.b. Dans le TIM

Le protocole des dénombrements microbiens est le même que celui décrit pour les fromages.

2.10. Analyse physico-chimique

Le pH a été analysé directement dans la pâte des fromages (J1, 7, 14, 20 et 30-35). Le pH a été mesuré avec un pH mètre 926 VTV équipé d'une électrode de type 406 MX (Mettler-Toledo SA, Viroflay, France). L'activité de l'eau (a_w) a été mesurée avec un LabMaster-aw (Novasina, Lachen, Suisse).

2.11. Expression des Shiga-toxines

Une recherche de l'expression des gènes *stx* (ARNm et toxines) a été réalisée sur les échantillons recueillis avant l'introduction dans le digesteur (mixture au t0) et au niveau des accumulations des sorties iléales (Tableau 11) (n=3).

2.11.a. Expression du gène *stx*

Un total de 2 mL de l'échantillon (mixture eau + aliment ou accumulation des sorties iléales) a été centrifugé (3 min x 10000 g), puis le culot bactérien a été repris dans une solution de stabilisation (RNA Protect, Qiagen). Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy commercialisé par la société Qiagen. Une étape de digestion a été réalisée à l'aide d'une DNase sur la colonne comme indiqué par le fournisseur (RNase free DNase set, Qiagen). Après extraction les ARN ont été dosés à l'aide du Qubit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). L'ADNc a été obtenu en rétro transcrivant 1 µg d'ARN à l'aide du kit MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fournisseur.

Le protocole utilisé pour doser l'expression des gènes *stx* par PCR quantitative (qPCR) a été basé sur une quantification absolue comme cela a été décrit par De Sablet *et al.* (2008). Une banque d'amplicons a été constituée pour les gènes *stx1*, *stx2* et le gène de ménage *tufA* avec les amorces décrites par, réciproquement, Possé *et al.* (2007), Jelacic *et al.* (2003) et De

Sablet *et al.* (2008). L'ADN de la souche Sakai a été utilisé comme matrice (Ogura *et al.*, 2007a). Des courbes standards ont été réalisées comme cela a été décrit précédemment (Miszczycha *et al.*, 2012). Les qPCR ont été réalisées à l'aide des amorces et des conditions décrites par Yoshitomi *et al.* (2006) pour les gènes *stx1* et *stx2* et De Sablet *et al.* (2008) pour le gène de ménage *tufA*. Chaque réaction de PCR (20 µL) était composée de : 1X de Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), amorces aux concentrations décrites par les auteurs précédemment cités, de l'eau DNA/DNase free (Qiagen) et de 2 µL de la suspension d'ADN.

Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel du thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems).

2.11.b. Detection de la Shiga-toxine

Le dosage des toxines a été réalisé par une méthode de type ELISA à l'aide du kit RIDASCREEN® Verotoxin (R-Biopharm, Saint-Didier-au-Mont-d'Or, France). La lecture des résultats a été effectuée sur le lecteur de microplaque Opsys MR (ThermoLab systems, Issy Les Moulineaux, France) à 450nm.

2.12. Analyses statistiques

Les résultats présentés sont des moyennes de dénombrements, +/- l'écart type (n=3). Les niveaux microbiens au cours de la digestion dans le TIM ont été comparés aux taux des différentes flores microbiennes avant l'introduction dans le digesteur et ont été exprimés en pourcentages. Une analyse de la variance (ANOVA) des mesures répétées suivie d'un test *post hoc* a été effectuée avec le logiciel SAS 9.1 Software (SAS 9.1 Software, Inc, Cary, NC). Les effets ont été considérés comme significatifs lorsque la p_{value} du test était inférieure à 5%.

3. Résultats

3.1. Acido résistance

Les résultats du test de l'activité GAD sont présentés dans le Tableau 10. Après 4 heures d'incubation, le réactif GAD contenant la souche *E. coli* O26:H11 a révélé une couleur verte alors que la couleur du réactif était resté jaune pour le contrôle. La décarboxylation de l'acide glutamique a permis une augmentation du pH. Cette augmentation a donc entraîné un changement de couleur du vert de bromocrésol : le réactif GAD est passé d'une couleur jaune à une couleur verte. Étonnamment, le réactif GAD contenant la souche *E. coli* O157:H7 présentait une couleur intermédiaire entre le jaune et le vert.

3.2. Flores microbiennes des fromages

3.2.a. Comportement des STEC O26:H11 et O157:H7

La moyenne des résultats des dénombrements est présentée dans la Figure 19. La concentration des 2 souches STEC a augmenté au cours des premières heures de la fabrication. Au jour 1, les taux des *E. coli* O26:H11 et O157:H7 avaient atteint des valeurs comprises entre 4 et 5 \log_{10} CFU.g⁻¹. Au cours de l'affinage et de la conservation des fromages, les taux des STEC sont restés constant aux alentours de 4 \log_{10} CFU.g⁻¹.

3.2.b. Comportement des autres populations microbiennes

La moyenne des niveaux des flores microbiennes est présentée dans la Figure 19. Les taux des entérocoques ont augmenté et atteint un pic de 6,8 \log_{10} CFU.g⁻¹ au bout de 14 jours pour l'expérience A (fromages inoculés avec la souche STEC O26:H11). Cependant, pour l'expérience B (fromages artificiellement inoculés avec la souche STEC O157:H7), la concentration des entérocoques n'a atteint qu'un taux maximum de 5 \log_{10} CFU.g⁻¹ au 20^{ème} jour. Pour les deux expériences, les taux d'entérocoques sont restés constants jusqu'au

35^{ème} jour. Les taux des leuconostocs producteurs de dextrans et des lactobacilles ont augmenté de façon constante après les 24 premières heures de fabrication et atteint, respectivement, 7,5 et 8,6 log₁₀ CFU.g⁻¹ au 35^{ème} jour pour les deux expériences. Les taux des bactéries d'affinage mais aussi des bactéries mésophiles et thermophiles ont augmenté de 3 à 4 log₁₀ CFU.g⁻¹ au cours de la fabrication des fromages et sont restés relativement constants jusqu'au 35^{ème} jour pour les deux expériences. Les taux des levures et des moisissures ont augmenté légèrement après les 24 premières heures de fabrication, puis sont restés relativement constants aux alentours de, respectivement, 6 et 5 log₁₀ CFU.g⁻¹ pour les deux expériences. Les concentrations des bactéries Gram-négatives sont restées constantes (4 et 3 log₁₀ CFU.g⁻¹ respectivement) au cours des premières heures de la fabrication pour les deux expériences. Après le premier jour de fabrication, la concentration des bactéries Gram-négatives a augmenté et atteint 6 log₁₀ CFU.g⁻¹. Elle est ensuite restée stable.

3.3. Caractéristiques physico-chimiques

Pour les 2 expériences, quels que soient les STEC inoculés, le pH dans la pâte des fromages a diminué de 6,71 jusqu'à 5,2 au cours du premier jour de fabrication, puis diminué jusqu'au 7^{ème} jour pour atteindre environ 5,1. Puis, le pH a augmenté pour atteindre au 28^{ème} jour 5,16 pour l'expérience A et 5,33 pour l'expérience B.

Les valeurs d'a_w sont restées constantes dans la pâte des fromages avec une valeur de 0,96.

3.4. Digestion artificielle dans le TIM

3.4.a. Comportement des STEC O26:H11 et O157:H7

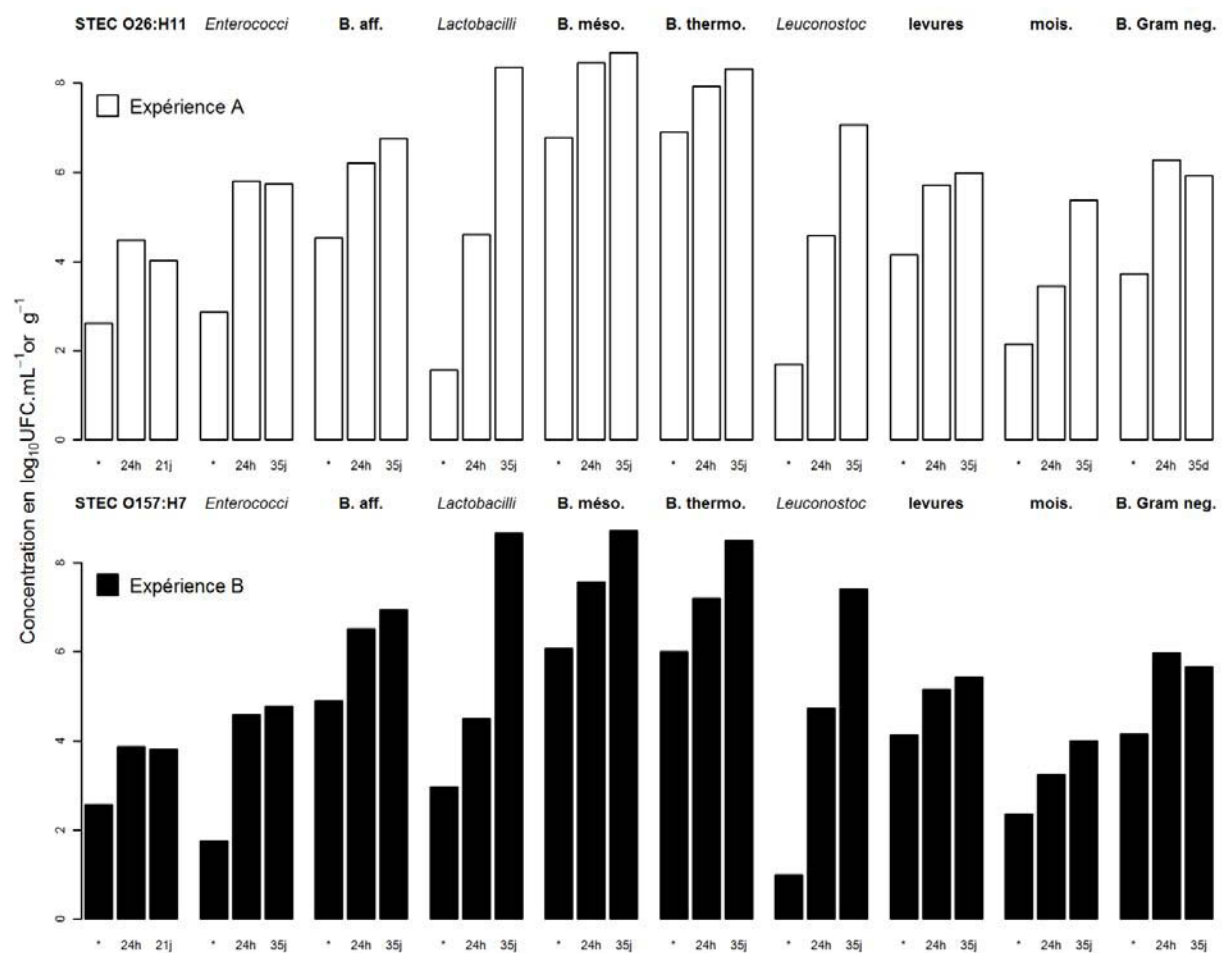
L'évolution des STEC au cours de la digestion artificielle des fromages dans le TIM a été déterminée en comparant les niveaux des STEC avec les mesures des concentrations du bleu dextran. Le bleu dextran est un marqueur de transit qui présente l'avantage de ne pas être absorbé ni dégradé au cours de la digestion. Ce marqueur peut donc correspondre à 100% théorique du taux de survie des bactéries. La concentration du bleu dextran à l'intérieur du

TIM dépend des volumes des différents compartiments digestifs, des dilutions par les sécrétions digestives et du trajet du chyme entre ces différents compartiments.

Le taux de survie des souches STEC O26:H11 et O157:H7 dans chaque compartiment du TIM est représenté dans la Figure 20.

Figure 19. Moyennes des niveaux des STEC ainsi que des autres populations microbiennes au cours des expérimentations A et B.

* : indique l'étape d'inoculation des STEC dans le lait. B. : bactérie ; méso. : mésophile ; thermo. : thermophile ; mois. : moisissures ; neg. : négatives.



Au cours du transit dans le compartiment stomacale du TIM, le taux de la souche *E. coli* O157:H7 721.4 a diminué significativement au cours de la première heure de digestion ($P < 0,001$, $n=3$). Au bout de 150 min, seulement 0,2 % (+/- 0,2%) des *E. coli* O157:H7 a pu être

dénombré alors que le taux du marqueur de transit était de 14,3 % +/- 0,3 %. En ce qui concerne la souche STEC O26:H11 F15338, une diminution significative de son taux a été observée au bout de 90 min de digestion. Les pourcentages de viabilité observés pour cette souche ont aussi été inférieurs à ceux observés pour le marqueur de transit. Au bout de 150 min, 1,8 % (+/- 1,7 %) des *E. coli* O26:H11 ont pu être dénombrés alors que le taux du marqueur de transit était de 14,3 % +/- 0,3 %. La survie de la souche STEC O157:H7 a été plus faible que celle de la souche STEC O26:H11 au cours de cette digestion artificielle.

Dans le duodénum, une diminution du taux de la souche STEC O157:H7 a été observée à partir de 120 min de digestion ($P < 0,01$). En ce qui concerne la souche STEC O26:H11, sa courbe de viabilité est restée similaire à celle du marqueur de transit avec une exception à 60 min : la courbe de viabilité d'*E. coli* O26:H11 avait dépassé celle du marqueur. Cette augmentation soudaine pourrait résulter d'un biais au cours du dénombrement.

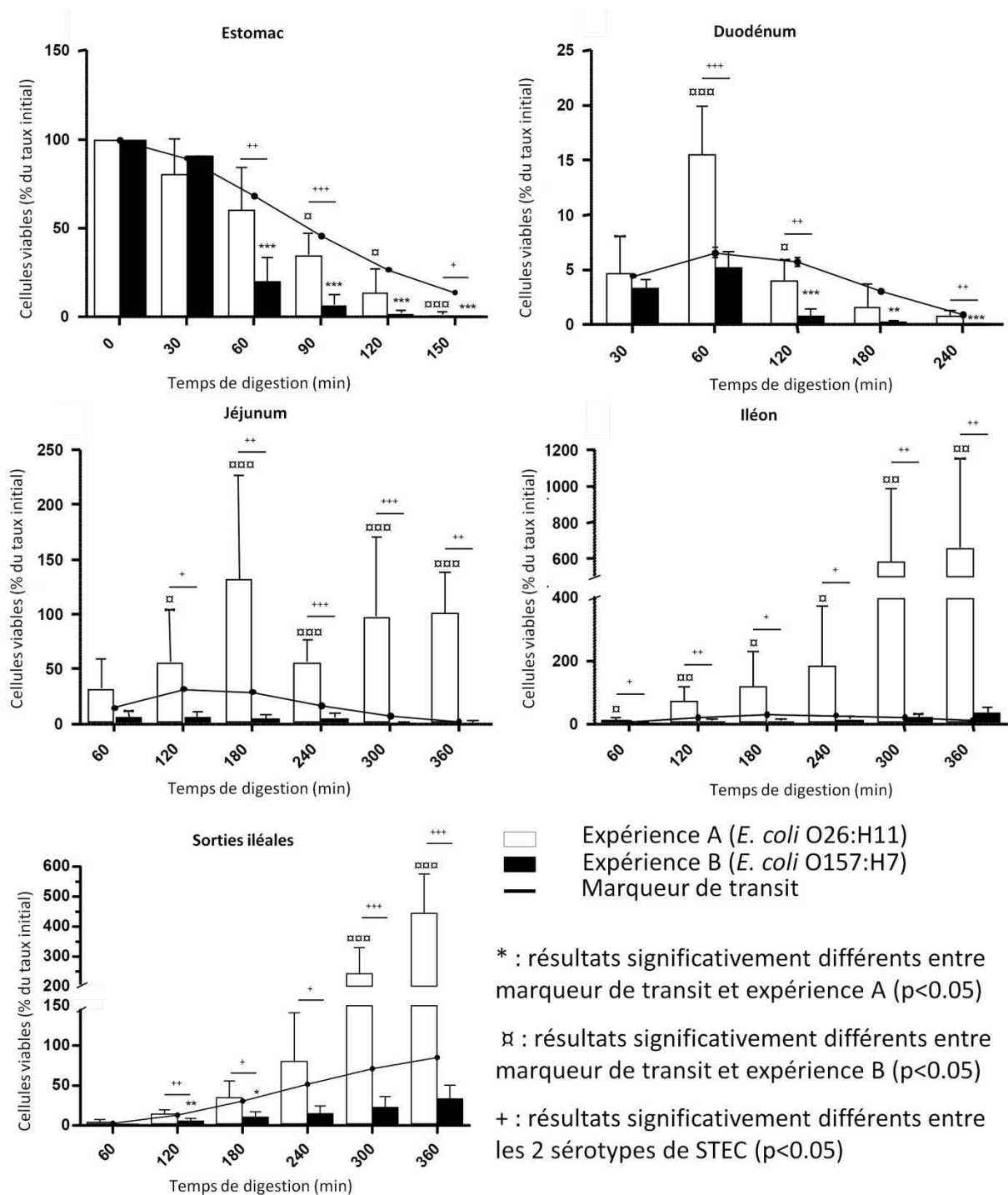
Dans le jéjunum, la courbe de viabilité de la souche STEC O157:H7 est restée inférieure à la courbe du marqueur de transit, même s'il n'a pas été observé de différence significative entre les deux. Les pourcentages obtenus pour la souche *E. coli* O26:H11 ont, quant à eux, été significativement supérieurs ($P < 0,05$) à ceux du marqueur de transit à partir de 120 min et ce jusqu'à la fin de la digestion, indiquant une reprise de la croissance de cette souche dans ce compartiment. Au bout de 360 min de digestion, le pourcentage des *E. coli* O26:H11 était largement supérieur à celui du marqueur de transit (102 % (+/- 36,7 %) contre 2,1 % (+/- 4 %) pour le marqueur de transit, $P < 0,01$).

Dans l'iléon, une reprise de croissance non significative a été observée au bout de 360 min pour la souche 721.4 de sérotype O157:H7 (36 % (+/- 12 %) contre 13% (+/-1 %) pour le marqueur de transit. En ce qui concerne la souche de sérotype O26:H11, une reprise de la croissance a été observée dès 60 min de digestion. A 360 min de digestion, le pourcentage des *E. coli* O26:H11 était largement supérieur à celui du marqueur de transit (663,2 % (+/- 493,1 %) contre 12,6 % (+/- 1,1 %) pour le marqueur de transit, $P < 0,01$).

Le taux des cellules viables accumulées au niveau de la sortie iléale est indiqué sur la Figure 20. Les pourcentages obtenus pour la souche STEC O157:H7 et le marqueur de transit n'ont pas été significativement différents ($P < 0,05$) alors qu'une différence significative a été observée entre la courbe de viabilité de la souche STEC O26:H11 et celle du marqueur de transit et ce à partir de 300 min de digestion. A 360 min de digestion, les pourcentages

obtenus pour la souche STEC O26:H11 étaient 13 fois supérieurs à ceux obtenus pour la souche STEC O157:H7 (531 % contre 39 %).

Figure 20. Taux de survie des souches STEC au cours de la digestion artificielle dans les différents compartiments du TIM ainsi qu'au niveau des sorties iléales (SIC).



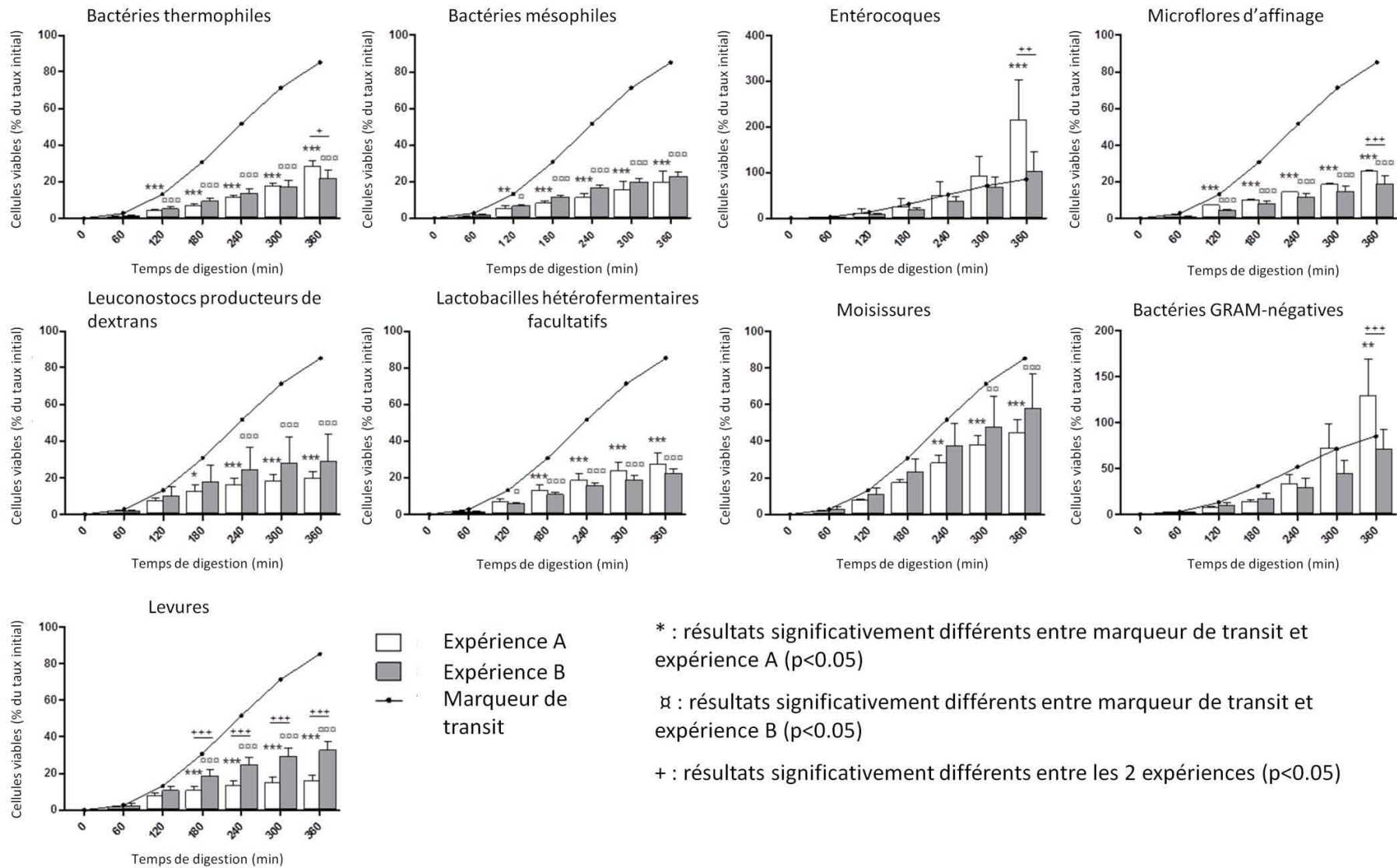
3.4.b. Survie des autres flores microbiennes au cours de la digestion

Les taux des cellules viables accumulées au niveau de la sortie iléale sont indiqués dans la Figure 21. Le taux de viabilité a diminué significativement pour les bactéries mésophiles et thermophiles, les flores d'affinage, les leuconostocs, les bactéries lactiques ainsi que pour les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs à partir de 60 min de digestion ($P < 0,001$). Au bout de 360 min de digestion, moins de 35 % de ces microflores ont pu être dénombrées. Pour les levures et les moisissures, leur viabilité a diminué de façon significative dès 120 min de digestion ($P < 0,05$) avec un taux de perte de viabilité plus fort pour les levures que pour les moisissures. Au bout de 360 min de digestion, seuls les taux de survie des levures présentaient une différence entre les 2 expériences : leur taux de survie a été plus élevé dans l'expérience B (38 % contre 19 %, $P < 0,01$). La viabilité des entérocoques et des bactéries Gram-négatives n'a pas été influencée par le processus de digestion ($P > 0,05$). Néanmoins, au bout de 360 min de digestion, une reprise de croissance des entérocoques a été observée dans l'expérience A.

3.5. Expression des Shiga-toxines

Les quantités d'ARN obtenues après purification n'ont pas été suffisantes ($< 0,01 \mu\text{g}$) pour permettre la quantification de l'expression des gènes *stx*. Le dosage de la toxine via le test ELISA n'a pas permis de détecter la présence de Shiga-toxine au cours de ces expérimentations.

Figure 21. Taux de survie des microflores fromagères au cours de la digestion artificielle par le TIM au niveau des sorties iléales.



4. Discussion

A notre connaissance, cette étude est la première destinée à étudier le comportement de 2 souches STEC appartenant aux sérotypes O26:H11 et O157:H7 au cours de la digestion artificielle de fromages au lait expérimentalement contaminés. Il est nécessaire de souligner qu'au cours de la fabrication mais également de la digestion des fromages toutes les souches (microflores fromagères et STEC) ont probablement été stressées. Or, ce stress peut induire un état viable mais non-cultivable (Khan *et al.*, 2010). La diminution du taux de certaines microflores lors de la digestion peut donc être la conséquence d'une mortalité de celles-ci ou bien d'un état viable mais non-cultivable les rendant ainsi indénombrables.

4.1. Comportement des différentes microflores dans le fromage

Au cours de la fabrication du fromage de type PPNC, le comportement des STEC a été relativement similaire à celui observé lors de notre précédente étude (Miszczycha *et al.*, 2013). Une augmentation des taux des STEC a été observée au cours des premières heures de la fabrication, puis les taux des STEC sont restés stables au cours de l'affinage. Néanmoins, la croissance de la souche STEC O26:H11 a été plus faible que celle qui avait été observée lors de cette première étude. Il est possible que les microflores naturellement présentes dans le lait cru, en interaction avec les ferments ajoutés, aient pu impacter positivement ou négativement la croissance des souches STEC (Duffy *et al.*, 1999).

Au cours de nos essais, les dénombrements mis en œuvre ont révélé que les taux de certaines populations microbiennes étaient différents entre les deux essais A et B. Par exemple, le taux des entérocoques a été, tout au long de la fabrication, de l'affinage et de la conservation du fromage, 10 fois plus élevés dans les fromages de l'expérience A que dans ceux de l'expérience B. Il a également été observé des taux très élevés des bactéries Gram-négatives (dont des coliformes) dans les laits utilisés pour les 2 séries de fabrication. Au cours de ces challenges-tests, le taux des bactéries Gram-négatives a été 10 fois supérieur à

celui des STEC tout au long de l'affinage et de la conservation de ces fromages. Ces taux ont pu, d'une part, impacter le comportement des STEC et, d'autre part, perturber leur dénombrement

Il est important de souligner que si les taux des populations microbiennes ont été similaires pour les expériences A et B (à l'exception des entérocoques), leur composition qualitative a pu différer d'une expérience à l'autre.

4.2. Evolution des STEC au cours de la digestion

Au cours du passage dans les 2 premiers compartiments du TIM, l'estomac puis le duodénum, le taux des STEC a fortement diminué. A l'inverse, dans le jéjunum, l'iléon et au niveau des sorties iléales (correspondantes à l'entrée dans le colon), une reprise de la croissance des STEC a été observée. Différents paramètres physico-chimiques peuvent expliquer ces observations.

4.2.a. Facteurs induisant une diminution du taux des STEC

Au cours du passage dans l'estomac, comme cela était prévisible, une forte diminution du taux des souches STEC (mortalité et/ou état viable mais non-cultivable) a été observée. Ce phénomène a pu résulter d'un effet synergique entre le pH extrêmement acide du compartiment (pH de 2 à T0, puis de 6 au bout de 5 min de digestion jusqu'à 1,7 à 300 min de digestion) et l'action des enzymes de digestion (pepsine et lipase). De telles conditions expliquent pourquoi le fluide gastrique est considéré comme la première barrière de défense vis-à-vis de nombreuses infections (Smith, 2003). La diminution de la viabilité des STEC dans le duodénum peut quant à elle résulter de l'action des sels biliaires comme cela avait déjà été supposé (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011 ; Thanassi *et al.*, 1997).

Néanmoins, les STEC ont été capables de survivre au passage dans ces 2 compartiments.

La survie des souches STEC au cours de la digestion stomacale peut être liée à une adaptation à l'acidité. En effet, les « effets barrières » rencontrés au cours de la fabrication des fromages (température de 10 °C au cours de l'affinage, pH aux alentours de 5, compétitions microbiennes...) ont pu permettre aux STEC de s'adapter aux stress mais

également de les rendre plus à même de répondre de manière efficace à de nouveaux stress. Jordan *et al.* (1999a) avaient émis l'hypothèse que l'adaptation d'*E. coli* O157:H7 au pH acide mais non létal de fromages pouvait favoriser sa survie dans l'environnement stomacale. L'acido-résistance de ces souches STEC peut aussi expliquer leur survie : les deux souches testées, la souche F15338 et la souche 721.4, possèdent les principaux gènes impliqués dans les mécanismes d'acido-résistance (Castanié-Cornet *et al.*, 2010 ; Foster, 2004 ; Lin *et al.*, 1995 ; Navarro Llorens *et al.*, 2010 ; Zhao & Houry, 2010). De plus, Mao *et al.* (2006) ont démontré que la production d'un polymère exopolysaccharidique, l'acide colanique pourrait agir comme une barrière de protection, permettant à *E. coli* O157:H7 de survivre à la digestion. Par ailleurs, des études ont montré que les acides gras des aliments eux mêmes pourraient protéger les STEC au cours de leur passage dans l'estomac (Waterman & Small, 1998). Le pH dans l'estomac varie constamment au cours de la digestion et est influencé par l'effet tampon des aliments. Koseki *et al.* (2011) ont émis l'hypothèse qu'un gradient de pH pourrait se former au cours de la digestion dans l'environnement stomacale. Ce gradient pourrait dépendre à la fois de la nourriture mais aussi de l'éloignement de l'aliment vis-à-vis des parois de l'estomac d'où sont secrétés les fluides gastriques.

Par conséquent, des STEC viables bien que probablement stressés peuvent quitter l'estomac bien avant que le pH soit suffisamment acide pour être létale. Dans le duodénum, les sels biliaires peuvent avoir un impact sur la survie des STEC. Néanmoins, Mao *et al.* (2006) ont observé que les sels biliaires n'avaient qu'un effet limité sur la survie des *E. coli* O157:H7 testés au cours de leur étude. Or, la valeur de pH de 6 de ce compartiment est favorable à la croissance des STEC, mais il peut être suggéré que les STEC quittant l'estomac étaient trop stressés et ne pouvaient que maintenir leur viabilité dans ce compartiment. Les sécrétions pancréatiques pourraient enfin avoir un impact sur le comportement des STEC dans le duodénum, mais à l'heure actuelle, les mécanismes ne sont pas connus.

4.2.b. Facteurs permettant la reprise de la croissance des STEC

Dans le jéjunum et l'iléon, une reprise de la croissance des 2 sérotypes a été observée. Il est possible que les pH proches de la neutralité de ces 2 compartiments (respectivement 6,9 et

7,2), les concentrations des sécrétions digestives bien plus faibles que dans l'estomac et la température de 37 °C aient favorisé ce phénomène.

4.3. Evolution des autres flores microbiennes au cours de la digestion

L'évolution des différentes microflore a été similaire pour les 2 expériences, à l'exception des levures et des entérocoques. Le taux plus élevé des entérocoques dans le fromage pour l'expérience A pourrait expliquer la reprise de croissance observée en fin de digestion pour ces bactéries. En ce qui concerne les levures, *D. hansenii* et *Geotrichum candidum* ont été inoculés dans le lait en tant que ferments. Or, d'autres levures étaient peut être présentes naturellement dans les laits crus utilisés. L'hypothèse suivante peut être émise : des souches de levures plus résistantes à la digestion étaient présentes dans le lait utilisé pour l'expérience B.

4.4. Effet sérotype

Il est intéressant de noter qu'une différence de comportement a été observée entre la souche *E. coli* O157:H7 et la souche *E. coli* O26:H11 au cours de la digestion. Au niveau de l'estomac, le taux de la souche STEC O157:H7 a significativement diminué au bout de la première heure de digestion alors que le taux de la souche STEC O26:H11 a lui été significativement réduit qu'à partir de 90 min de digestion. Dans le duodénum, le taux de survie de la souche *E. coli* O26:H11 était aussi supérieur à celui de la souche *E. coli* O157:H7. Dans le jéjunum et l'iléon, la reprise de croissance de la souche de sérotype O26:H11 a été supérieure à celle de la souche de sérotype O157:H7. Au niveau des sorties iléales, le taux de survie/croissance de la souche *E. coli* O26:H11 a même été 13 fois supérieur à celui de la souche *E. coli* O157:H7.

Au niveau de l'estomac, la différence de comportement des souches appartenant aux 2 sérotypes a suggéré une capacité moindre de la souche *E. coli* O157:H7 à survivre dans l'environnement gastrique. Le test de l'activité de la glutamate décarboxylase a permis de

révéler que l'activité de cette enzyme était complète pour la souche appartenant au sérotype O26:H11 mais réduite de moitié pour la souche STEC O157:H7. Jung & Kim (2003) avaient observé que des souches possédant les gènes *gadA* ou *gadB* mutés induisaient une couleur intermédiaire entre le jaune et le vert lors du GAD assay. Cette couleur était identique à celle observée pour la souche STEC O157:H7. L'hypothèse selon laquelle un de ces deux gènes serait muté et donc inefficace pour la souche STEC O157:H7 721.4 peut être émise. De plus, la grande facilité du sérotype O26:H11 à survivre dans des environnements acides a déjà été observée (Elhadidy & Mohammed, 2012 ; Large *et al.*, 2005). En testant l'efficacité de l'activité GAD ainsi que celle du système oxydatif, ces auteurs ont démontré que des souches de sérotype O157:H7 étaient significativement moins résistantes à l'acidité que des souches appartenant à d'autres sérotypes tel que le sérotype O26:H11. Le sérotype O157:H7 apparaît donc bien moins adapté à la survie en milieu extrêmement acide que le sérotype O26:H11, ce qui confirmerait les résultats observés au cours de cette étude.

Son activité GAD étant diminuée, il serait donc probable que la souche STEC O157:H7 n'ait pas été en mesure de réguler correctement son pH intracellulaire lors du passage dans l'estomac. Par conséquent, cette souche a probablement été endommagée. Les différents mécanismes impliqués dans sa réponse au stress comme l'action des chaperonnes cytoplasmiques et périplasmiques (Hong *et al.*, 2012) ont probablement été perturbés. Ces dommages pourraient expliquer pourquoi la souche STEC O157:H7 a présenté plus de difficultés que la souche STEC O26:H11 à croître malgré les conditions physico-chimiques plus favorables de l'intestin. De nouvelles expérimentations seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Au niveau du duodénum, il est aussi possible que la souche STEC O157:H7 ait été plus sensible aux sécrétions biliaire et pancréatiques que la souche STEC O26:H11.

La différence de comportement observée entre la souche STEC O157:H7 et la souche STEC O26:H11 dans l'estomac peut être liée à l'activité de la glutamate décarboxylase. En revanche, la différence de comportement observée entre ces deux souches dans les compartiments simulant l'intestin grêle peut s'expliquer par 3 autres hypothèses (liées ou non) :

- Cette différence peut être le résultat de l'historique de ces souches (survie au cours de la fabrication de fromage et au cours de la digestion) et de leurs états physiologiques. La souche de sérotype O26:H11 apparaît moins stressée et mieux adaptée à la digestion que la souche de sérotype O157:H7.

- Les dénombrements d'*E. coli* O157:H7 obtenus lors de notre étude ont été comparés à ceux obtenus par Etienne-Mesmin et *al.* (2011). Ces derniers avaient inoculé artificiellement une souche de sérotype O157:H7 dans de la viande hachée qui par la suite avait été digérée dans le TIM. De plus, cette viande avait étéensemencée ou non avec une souche de *S. cerevisiae*. Ces auteurs avaient noté un effet antagoniste de *S. cerevisiae* vis-à-vis d'*E. coli* O157:H7. Nos résultats sont proches de ceux obtenus avec la contamination concomitante d'*E. coli* O157:H7 et de *S. cerevisiae*. Dans nos expérimentations A et B, les laits crus pouvaient être naturellement contaminés en levures mais avaient également étéensemencés par *D. hansenii* et *G. candidum*. Les levures en plus forte concentration dans l'expérience B auraient pu avoir inhibé la reprise de croissance de la souche *E. coli* O157:H7 dans le jéjunum et l'iléon. Par contre, l'impact aurait pu être moindre dans l'expérimentation A en raison d'un niveau de levures plus faible et/ou d'une moindre sensibilité de la souche *E. coli* O26:H11 aux agents antimicrobiens produits par ces levures.

- Il est possible que la croissance limitée de la souche STEC O157:H7 soit la conséquence directe de l'induction de prophages. En effet, les gènes *stx* sont portés par des phages de type lambdaïde et les stress induisent leur cycle lytique (Imamovic & Muniesa, 2012 ; Schmidt, 2001). Si la souche STEC O157:H7 est plus sensible aux conditions rencontrées que la souche STEC O26:H11, l'activation du cycle lytique du prophage pourrait réduire considérablement la population des *E. coli* O157:H7 tout en libérant des Shiga-toxines. D'autre part, la souche appartenant au sérotype O26:H11 semble avoir de meilleures dispositions à survivre dans un environnement extrêmement acide. Ces souches pourraient donc atteindre l'intestin dans un état moins stressé que les souches STEC O157:H7. Le prophage *Stx* n'induirait alors pas de cycle lytique et donc pas de libération de Shiga-toxine.

4.5. Expression des Shiga-toxines

Un dosage de l'expression des Shiga-toxines a été tenté au niveau des sorties iléales mais les résultats se sont révélés négatifs. Le protocole d'extraction des ARN, probablement du fait de la complexité des échantillons, n'a pas permis d'obtenir suffisamment d'ARN pour la suite du protocole. Pour le dosage de la toxine par la méthode ELISA, les résultats négatifs peuvent être attribués soit au fait qu'aucune toxine n'avait été produite, soit au fait que la quantité de toxines libérées était trop faible pour être détectée par le kit employé. La mise au point d'un protocole plus performant sera nécessaire afin de pouvoir détecter et quantifier la libération de ces toxines même à faible taux au cours de la digestion. Si cela ne s'avérait pas possible, il faudrait alors envisager de travailler avec un taux supérieur de STEC afin d'accroître la quantité de toxines libérées, si production de toxine il y a.

5. Conclusion

Il a été démontré que 2 souches appartenant aux sérotypes O157:H7 et O26:H11 pouvaient survivre à la fois à la fabrication d'un fromage de type pâte pressée non-cuite et à la digestion artificielle de celui-ci. Cependant, ces données doivent être interprétées avec prudence car les STEC ont été inoculés à un taux élevé dans le lait (500 UFC.mL^{-1}). Ce taux élevé a pu avoir une influence sur le comportement des souches dans les fromages mais également dans le digesteur artificiel. Par ailleurs, le système TIM ne reproduit que les conditions physico-chimiques de la lumière de l'intestin. Les interactions avec le microbiote intestinal, les entérocytes mais aussi le système immunitaire n'ont pas été prises en compte. Or, elles peuvent moduler le comportement des STEC dans les derniers compartiments de l'intestin grêle.

Plusieurs questions cependant restent en suspens. Le comportement différent observé pour les 2 souches testées au cours de cette étude est-il uniquement la conséquence des mécanismes d'acido-résistance ? Est-ce un effet souche ou un effet sérotype ? Et sont-elles pathogènes ?

Il sera aussi nécessaire d'optimiser les protocoles testés afin de pouvoir observer et mesurer la production des Shiga-toxines au cours de la digestion afin de pouvoir évaluer plus précisément la pathogénicité de ces souches au cours. En effet, Kailasan Vanaja *et al.* (2009) ont démontré que GadE, le principal activateur du système GAD, peut réguler négativement l'expression des gènes du locus d'effacement des entérocytes (le LEE) dans des conditions modérément acides. Il sera donc nécessaire d'étudier l'expression des gènes *gadE* et ceux du LEE pour la souche STEC O26:H11. En effet, comme le démontre cette étude, la souche STEC O26:H11 présente une acido-résistance forte et sur exprime probablement ce régulateur. Si tel est le cas, il est alors probable qu'elle ne puisse pas adhérer aux entérocytes ce qui réduirait considérablement la pathogénicité de cette souche STEC O26:H11.

6. Valorisation

Un article est en cours de rédaction et disponible en Annexe 9, il a été soumis dans la revue a comité de lecture Applied and Environmental Microbiology :

Survival of *E. coli* O26:H11 exceeds that of *E. coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses.

Stéphane D. Miszczycha, Jonathan Thévenot, Sylvain Denis, Cécile Callon, Valérie Livrelli, Monique Alric, Marie-Christine Montel, Stéphanie Blanquet-Diot, Delphine Thevenot-Sergentet

Discussion et Conclusion

Un des objectifs de cette thèse était de répondre à la question suivante : les fromages, en cas de contamination par des STEC, peuvent-ils présenter un risque pour le consommateur ? Afin d'y répondre, deux points majeurs ont été étudiés. Le premier a concerné l'étude du comportement des souches STEC au cours de la fabrication de fromages à base de lait cru. Le deuxième s'est intéressé à la digestion d'un fromage contaminé par ces bactéries : les STEC parviendraient-ils à survivre à une digestion et si oui, pourraient-ils être dangereux pour le consommateur ?

1. Croissance et survie des STEC dans les fromages à base de lait cru

L'objectif de cette partie était de déterminer si les barrières inhérentes aux différentes technologies fromagères (pH, a_w ...) peuvent favoriser la survie, ou l'inhibition des souches de STEC au cours de la fabrication et de l'affinage de fromages au lait cru.

Nos travaux ont souligné l'existence de 2 comportements différents des STEC en fonction des technologies testées.

1.1. Impact des facteurs physico-chimiques

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont mis en évidence que l'étape de chauffage des fromages de type pâte pressée cuite ou encore la forte acidification ($\text{pH} < 4,3$) au cours de l'étape de coagulation des fromages de type lactique chèvre inhibe la croissance des STEC. En revanche, une croissance des STEC a pu être observée au cours des 24 premières heures pour certaines technologies (pâte persillée et les 2 pâtes pressées non-cuites). Nos résultats ont montré qu'une chute de pH modérée (pH compris entre 7 et 5) au cours des premières heures de fabrication de ces fromages ne peut pas inhiber les STEC. Au mieux, elle peut ralentir leur croissance : comme cela a été décrit dans le mémoire bibliographique, les STEC peuvent croître dans une gamme de pH comprise entre 4,5 et 9. Durant un affinage

supérieur à 60 jours, la chute de l' a_w est un des facteurs qui permet une diminution du taux des STEC au cours de cette étape. L'effet synergique de ces différents facteurs (pH acide, chute de l' a_w , acides organiques...) peut aussi expliquer la diminution du taux des STEC lors d'affinage supérieur à 60 jours.

Il est important de rappeler que le taux d'inoculation des STEC au cours de ces challenges-tests a été supérieur au taux naturel de ces bactéries dans le lait, ce qui a pu favoriser leur croissance et leur survie. De nouvelles expériences avec un taux d'inoculation plus proche des taux naturels (1 à 10 UFC.mL⁻¹) devront être réalisées.

Le comportement des STEC pour d'autres types de fromages (pâtes molles, pâtes persillées au lait de vache...) reste à étudier.

1.2. Effet sérotype

L'autre point notable de nos expérimentations a été la mise en évidence d'une différence de comportement entre les souches de sérotype O157:H7 et celles des sérotypes O26:H11, O103:H2 ou encore O145:H28. En effet, pour les technologies où une croissance des STEC a pu être mise en évidence, les souches *E. coli* O157:H7 ont connu une croissance bien plus faible que la croissance des souches appartenant aux autres sérotypes testés. De plus, lorsque l'affinage était suffisamment long pour permettre une diminution du taux des STEC, la décroissance d'*E. coli* O157:H7 était plus rapide. Cette sensibilité des souches *E. coli* O157:H7 au processus de fabrication fromagère pourrait expliquer la prévalence plus faible de ce sérotype dans les fromages en comparaison notamment au sérotype O26:H11. Des expérimentations devront être réalisées avec de nouvelles souches afin de confirmer d'une part cet effet sérotype et d'autre part l'absence d'effet souche observé au cours de cette étude.

Afin d'expliquer cet effet sérotype, différentes hypothèses peuvent être émises. Soit les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2 et O145:H28 sont de meilleures compétitrices que les souches appartenant au sérotype O157:H7. Soit les mutations propres à la plupart des *E. coli* O157:H7 (perte de la capacité à fermenter le sorbitol, perte de l'activité de la β -glucuronidase) ont un impact sur le devenir de ce sérotype au cours de la fabrication fromagère. Les souches de sérotype O157:H7 pourraient aussi être plus sensibles

aux différents stress rencontrés lors de la fabrication fromagère que les souches des autres sérotypes testés. Ceci provoquerait l'activation du cycle lytique du prophage Stx et donc entraînerait une forte diminution de la population d'*E. coli* O157:H7 dans le fromage.

Afin de vérifier ces hypothèses, les études s'orienteront vers :

- l'évaluation de l'état physiologiques de ces STEC au cours de la fabrication de fromage : induction des différentes réponses au stress comme RpoS, mais aussi vérifier si les souches STEC sont dans un état viable mais non-cultivable,
- le test d'autres souches appartenant au sérotype O157:H7 dont des souches capables de fermenter le sorbitol et possédant l'activité β -glucuronidase,
- la mesure et la comparaison de la libération des phages Stx par les différents sérotypes de STEC testés au cours de la fabrication des fromages.

Pour finir, un séquençage complet des souches STEC issues du fromage pourra être envisagé : l'effet sérotype observé pour *E. coli* O157:H7 pourrait s'expliquer par ses caractéristiques intrinsèques. Ainsi, les gènes impliqués dans cet effet sérotype pourront être identifiés. Dans un deuxième temps, l'expression de ces gènes pourra être testée.

1.3. Retombées pour les filières fromagères

1.3.a. Leviers d'action pour la maîtrise des STEC

Les résultats de ces travaux soulèvent le problème de la détection des STEC dans les fromages : en effet, les taux de contamination naturel des laits par les STEC sont très faibles (1 à 10 UFC.mL⁻¹). De plus, les laits sont mélangés dans des tanks ce qui augmente la dilution des STEC. Enfin, la répartition des STEC semble très hétérogène dans ce type d'aliment et d'autre part, nos travaux ont montré qu'au bout des 24 premières heures de fabrication, les taux des STEC avaient atteint leur maximum pour les technologies « favorables » à leur croissance. La détection des STEC dans les fromages pourrait donc être entreprise à ces points précis. Par ailleurs, l'analyse des caillés pourrait apporter une solution à la répartition hétérogène de ces bactéries : le brassage des grains de caillé après le découpage pourrait améliorer l'homogénéisation des bactéries recherchées. Ces modalités d'analyses permettraient une détection rapide des STEC bien avant la mise sur le marché (excepté pour

les fromages frais). Des études supplémentaires devront être réalisées afin de déterminer plus précisément les points de fabrication où le taux de croissance des STEC est maximal.

Nos résultats ont démontré que la température, la durée et la cinétique d'acidification ainsi que la durée de l'affinage sont des leviers d'action efficaces pour la maîtrise des STEC dans le fromage. Bien qu'il ne soit pas possible de modifier totalement les schémas technologiques de ces aliments, de nouveaux challenges-tests pourront être réalisés en agissant sur ces caractéristiques technologiques dans la mesure du possible sans affecter les schémas technologiques.

L'impact de la microflore sur le comportement des STEC n'a pas été abordé lors de ma thèse. Néanmoins, les interactions entre différentes microflores et les STEC ont été étudiées. A titre d'exemple, le potentiel inhibiteur de *Hafnia alvei*, entérobactérie fréquemment isolée dans les fromages au lait cru, sur les STEC au cours de la fabrication d'un fromage de type pâte pressée non cuite a été mis en évidence (Delbès *et al.*, 2013). Ces observations montrent que certaines bactéries peuvent avoir un effet antagoniste vis-à-vis des STEC. De telles bactéries pourraient donc être employées (seules ou en cocktail) pour limiter le développement des STEC dans les fromages à condition de démontrer qu'elles ne sont ni pathogènes ni capables d'altérer les caractéristiques organoleptiques du fromage. En revanche, le cas particulier des *Penicillium* a été étudié par Lee *et al.* (2012). Les auteurs ont démontré que 2 souches, une de *P. roqueforti* et une de *P. camemberti*, pouvaient favoriser la croissance des STEC. Il faut toutefois préciser que ces travaux ont été réalisés *in vitro*. Il serait donc intéressant de vérifier si d'autres souches de *Penicillium* présentent au contraire une activité antagoniste vis-à-vis des STEC dans le fromage : auquel cas, ces souches pourraient être préférentiellement sélectionnées pour les fabrications fromagères.

1.3.b. Caractérisation de la virulence des souches issues de fromages

La virulence des souches STEC contaminant les laits et fromages pourrait être associée à leurs caractéristiques intrinsèques. Le séquençage complet des souches issues des produits laitiers pourra être envisagé. Néanmoins, la présence mais surtout l'expression des facteurs de virulences des souches issues de ces produits laitiers devront être analysés. Une attention particulière pourra être portée aux facteurs de virulence tels que ceux présents dans le LEE

(*eae*, TIR, MAP, *espF*, *espB*, *espZ*...), ou non (Tccp1, Tccp2, Saa, *aggR*), les effecteurs Nle, les ilots de pathogénicité (OI122, OI71...) ou encore des toxines comme l'entérohémolysine, l'entérohémolysine thermostable EAST1, la cytotoxine subtilase (SubAB), les cyclomodulines CDT, sans oublier bien évidemment les Shiga-toxines et les gènes impliqués dans les principaux mécanismes de résistance à l'acidité (*rpoS*, le système GAD...). Au niveau génétique, une recherche de ces principaux facteurs de virulence pourra être effectuée sur ces souches par PCR. En ce qui concerne l'expression de ces facteurs de virulence, celle-ci pourra être réalisée dans différents milieux pouvant simuler la matrice fromagère ou le tube digestif avec ou non la présence d'un agent inducteur de la Shiga-toxine (mitomycine-C). L'expression de ces facteurs pourra être observée :

- au niveau transcriptomique, via des PCR quantitatives couplées à la rétro-transcription des ARNm de ces gènes,
 - au niveau protéomique : pour les toxines libérées, une mesure par ELISA pourra être effectuée. Pour les autres facteurs de virulences, une étude du protéome plus large pourra aussi être envisagée via des outils de marquages radioactifs des protéines néo-synthétisées, d'électrophorèse bidimensionnelle et de séquençage des protéines ou de Western Blot.
- De même, la quantification de la libération de particules phagiques Stx pourra aussi être envisagée.

Ainsi, cette étude *in vitro* des souches STEC issues de produits laitiers et de souches EHEC permettra de déterminer si les souches STEC isolées de fromages présentent à la fois un matériel génétique, mais aussi une capacité à l'exprimer identique à celui des souches issues de patients.

2. Survie au cours de la digestion

Le comportement (croissance et survie) des STEC au cours de la digestion a été très peu étudié. Nous ne connaissons pas à ce jour le comportement de souches STEC ayant survécu à une technologie fromagère dans le tube digestif d'un homme. L'objectif de cette partie était

donc de décrire le devenir de souches STEC artificiellement inoculées dans du lait cru au cours de la digestion artificielle des fromages fabriqués avec ces laits.

Nos travaux ont permis d'observer le comportement de 2 souches STEC appartenant aux sérotypes O26:H11 et O157:H7 dans les différents compartiments de l'appareil digestif.

2.1. Comportement des STEC au cours de la digestion artificielle

Dans notre étude, la viabilité des 2 souches STEC O26:H11 et O157:H7 a diminué au cours du passage dans l'estomac ainsi que dans le duodénum. Une reprise de croissance à l'intérieur du jéjunum et de l'iléon a ensuite été observée. Le comportement de la souche *E. coli* O157:H7 721.4 a été similaire à celui de la souche *E. coli* O157:H7 EDL 933 inoculée concomitamment à une souche de *S. cerevisiae* par Etienne-Mesmin *et al.* (2011). Par contre, la souche *E. coli* O26:H11 F15338 a mieux survécu dans l'estomac et le duodénum et a connu une croissance beaucoup plus importante dans le jéjunum et l'iléon que la souche *E. coli* O157:H7. Plusieurs hypothèses, historique des souches, mécanisme de résistance à l'acidité GAD plus performant pour la souche *E. coli* O26:H11, microflore différente pour les différentes expérimentations, peuvent être émises pour expliquer ce phénomène.

Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec prudence. De nouvelles expérimentations devront être réalisées. En effet, seule une souche d'*E. coli* O26:H11 et une souche d'*E. coli* O157:H7 ont été testées. De plus, la technologie fromagère choisie pour ces expérimentations était favorable à la croissance et au maintien de la concentration des STEC. Cela permettait d'obtenir au moment de l'étape de digestion suffisamment de STEC pour pouvoir les dénombrer. Tester le comportement des STEC issues de technologies fromagères aux conditions plus stringentes (affinage long...) et donc dans un état plus stressé, sera aussi intéressant. Il sera aussi nécessaire de tester le comportement de STEC au cours de la digestion artificiel de fromages dont les laits auront été inoculés en STEC à des taux plus proches des taux naturels (1 à 10 UFC.mL⁻¹).

2.2. Pathogénicité ?

Le dosage des Shiga-toxines réalisé n'a pas permis d'observer la libération des toxines au niveau des sorties iléales. Ces résultats peuvent être attribués à l'absence de production de toxines ou à leur non-détection par le kit employé à cause de leur faible concentration. La mise au point d'un protocole plus performant sera nécessaire afin de pouvoir détecter et quantifier la libération de ces toxines même à faible taux au cours de la digestion.

A partir des connaissances concernant les mécanismes de régulation des gènes du LEE et des gènes impliqués dans la résistance à l'acidité, une hypothèse pouvant expliquer la moindre pathogénicité des souches STEC issues de produits laitiers peut être émise.

Parmi les différents sérotypes de STEC issus de produits laitiers, le plus étudié est *E. coli* O26:H11 et tous les travaux publiés à ce jour démontrent qu'il est largement plus adapté à la survie dans les milieux acides qu'*E. coli* O157:H7. Or, le mécanisme principal de l'acidorésistance en milieu extrêmement acide tel que l'environnement stomacale est le système GAD. Celui-ci est sous le contrôle d'un régulateur, GadE qui agit comme antagoniste du LEE. Grâce à ce système, les souches *E. coli* O26:H11 peuvent aisément survivre au passage dans l'estomac, suivre le trajet dans l'intestin grêle et entrer dans le colon. Sous l'action antagoniste de GadE « hyper-stimulé », le LEE pourrait ne pas être exprimé et les souches STEC O26:H11 ne pourraient donc pas s'arrimer aux entérocytes : elles continueraient leur chemin dans le colon sans provoquer l'effacement des microvillosités des entérocytes. Un scénario contraire pourrait alors être proposé pour le comportement d'*E. coli* O157:H7 : dans l'hypothèse d'une moindre activation de GadE, cet STEC pourrait exprimer les gènes du LEE et provoquer l'effacement des microvillosités des entérocytes, provoquant l'induction d'une réponse inflammatoire. Celle-ci, cumulée aux différents stress subis par la bactérie, pourrait alors déclencher l'induction du cycle lytique du prophage Stx et ainsi la production de la Shiga-toxine. Différents travaux sur des systèmes de cellules en culture seront nécessaires afin de vérifier cette hypothèse, ainsi que des dosages de l'expression du gène *gadE* et de ceux du LEE en condition acide et non acide pour des souches *E. coli* O26:H11 et *E. coli* O157:H7.

2.3. Perspectives

Il sera nécessaire de tester d'autres souches de sérotype O157:H7 et O26:H11 (ainsi que d'autres sérotypes tels que O103:H2 ou encore O145:H28) afin de confirmer l'existence d'un effet sérotype au cours de la digestion. L'étude d'un bol alimentaire plus complexe (eau, légume, viande, pain, fromage) pourra également être envisagée afin de reproduire un repas complet. De plus, le TIM, même s'il a fourni des données très intéressantes en ce qui concerne le comportement des STEC de l'estomac à l'iléon, présente 2 inconvénients :

- le TIM simule uniquement la lumière intestinale. Toutes les interactions entre les STEC, la flore commensale, les entérocytes et le système immunitaire ne peuvent être reproduites dans ce système.
- Le colon n'est pas étudié dans ce modèle. Or de nombreuses études ont montré que la production de la toxine est effectuée dans le colon, lorsque les STEC parviennent à s'arrimer aux entérocytes via l'expression des gènes du LEE (ou autres).

Il sera donc nécessaire de transférer les sorties iléales du TIM dans un système de colon artificiel afin de suivre le comportement et l'expression des facteurs de virulence des STEC dans celui-ci. L'utilisation de culture de cellules afin de mimer l'épithélium intestinal pourra également être envisagée afin d'observer les capacités d'adhésion des STEC et la production des Shiga-toxines. De même, un modèle *ex vivo*, où les STEC sont cultivés dans des contenus filtrés de caecum de rats permettra d'intégrer l'impact des métabolites produits par les cellules intestinales et le microbiote colique sur la physiologie des STEC. Il pourra aussi être mis en place un modèle *in vivo* utilisant des rats dont la flore intestinale est contrôlée (flore conventionnelle, flore humaine traitées ou non à la streptomycine, rat axénique). Un tel modèle permettrait d'étudier le comportement des STEC *in vivo* dans un contexte physiologique proche des conditions d'une infection chez l'homme, notamment en mesurant l'impact du microbiote intestinal.

3. Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis d'observer le comportement de plusieurs sérotypes de STEC au cours de la fabrication de différentes technologies fromagères au lait cru, et leur comportement au cours de la digestion artificielle de ces fromages. Il permettra aux professionnels de la filière de mieux gérer le danger lié aux STEC dans leurs produits (prévention et détection). Néanmoins, de nombreuses questions restent toujours en suspens.

En ce qui concerne les cas d'infections liées à la présence des STEC dans les fromages, seules les épidémies sont recensées en France. Peu de données sont disponibles pour les cas sporadiques, qu'en est-il de leur réelle incidence ? De plus, ne prendre en compte que les symptômes les plus sévères comme le SHU n'induit-il pas une forte sous-estimation du nombre d'infections liées à la présence des STEC dans ces produits laitiers ?

Même si les STEC sont présents dans les fromages, sont-ils réellement pathogènes pour les humains ? Plus précisément, les facteurs biotiques et abiotiques rencontrés dans les fromages n'influencent-ils pas l'expression des facteurs de virulence des souches ?

Enfin, le rôle du phage Stx dans la genèse de souches pathogènes représente une menace non négligeable. Une compréhension plus approfondie des facteurs et mécanismes impliqués dans l'induction de son cycle lytique pourra peut-être permettre la mise au point de traitements capables de bloquer l'expression du gène *stx* : malgré l'importante diversité des facteurs de virulence existant chez les STEC, ce gène reste la clef de leur dangerosité.

Références

Bibliographiques

- Ackers, M. L., Mahon, B. E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Rice, D. H., Barrett, T. J. & other authors. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* 177, 1588–1593.
- Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T. & Birkhead, G. (1997). Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect* 119, 1–8.
- AFSSA. (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC).
- AFSSA. (2008). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines considérées comme pathogènes pour l'homme. *Saisine n°2008-SA-0122*. <http://www.afssa.fr/Documents/MIC2008sa0122.pdf>.
- AFSSA. (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. *Saisine n°2010-SA-0031*. <http://www.afssa.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>.
- Amirlak, I. & Amirlak, B. (2006). Haemolytic uraemic syndrome: an overview. *Nephrology (Carlton)* 11, 213–218.
- Andrade, J. R., Da Veiga, V. F., De Santa Rosa, M. R. & Suassuna, I. (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 28, 49–57.
- Anon. (2000). Guidelines for the control of infection with Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). Subcommittee of the PHLS Advisory Committee on Gastrointestinal Infections. *Commun Dis Public Health* 3, 14–23.
- Anonymous. (2004). Code of good hygienic practices for milking with automatic milking systems. *Bulletin of the International Dairy Federation* 386, 43–49.
- Anonymous. (2007). Good dairy farming practices related to primary production of milk and farm management. *Bulletin of the International Dairy Federation* 418, 3–42.
- Anonymous. (2008). Guide to Good Animal Welfare in Dairy Production. *International Dairy Federation, Brussels, Belgium*.

- Ansary, S. E. & Kaspar, C. W. (1997). Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 25, 131–134.
- ANSES. (2011a). Avis de l'ANSES Saisine n° 2010-SA-0031 Saisine(s) liée(s) n° 20008-SA-0122 - <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031-2.pdf>
- ANSES. (2011b). Avis de l'ANSES Saisine n° 2011-SA-0198 Saisine(s) liée(s) n° 2011-SA-0158 - <http://www.anses.fr/Documents/MIC2011sa0198.pdf>.
- Asper, D. J., Sekirov, I., Finlay, B. B., Rogan, D. & Potter, A. A. (2007). Cross reactivity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-specific sera with non-O157 serotypes. *Vaccine* 25, 8262–8269.
- Ateba, C. N. & Mbewe, M. (2011). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. *Research in Microbiology* 162, 240–248.
- Bastian, S. . & Sivelä, S. . (2000). *Escherichia coli* O157:H7: aspects of concern to the dairy industry. *Bulletin of the International Dairy Federation* 357, 57–62.
- Bauwens, A., Betz, J., Meisen, I., Kemper, B., Karch, H. & Müthing, J. (2012). Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*.
- Baylis, C. L. (2009). Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology* 62, 293–307.
- Becker, A. . (2005). Alberta *E. coli* outbreak tied to milk shakes. *Press release CIDRAP* 2005–05–13.
- 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 hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272, 1349–1353.
- Berdague, J. & Grappin, R. (1967). *Le lait* 67, 237–247.
- Berger, C. N., Crepin, V. F., Baruch, K., Mousnier, A., Rosenshine, I. & Frankel, G. (2012). EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *MBio* 3.
- Berry, E. D. & Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157:H7. In *Advances in Food and Nutrition Research*, pp. 67–117. Elsevier.

- Bettelheim, K. A. (2007). The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol* 33, 67–87.
- Betz, J., Bauwens, A., Kunsmann, L., Bielaszewska, M., Mormann, M., Humpf, H.-U., Karch, H., Friedrich, A. W. & Müthing, J. (2012). Uncommon membrane distribution of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in toxin-sensitive human glomerular microvascular endothelial cells. *Biol Chem* 393, 133–147.
- Beutin, L. (2006). Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 299–305.
- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I. & Orskov, F. (1988). Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 267, 576–588.
- Beutin, L., 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.
- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S. & Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 31, 2483–2488.
- Beutin, L., Steinrück, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G. & Appel, B. (2007a). Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol* 102, 630–639.
- Beutin, L. & Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot* 75, 408–418.
- Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. & Albrecht, N. (2007b). Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Appl Environ Microbiol* 73, 4769–4775.
- Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M. A., Khakhria, R., Janda, J., Bláhová, K. & Karch, H. (1998). Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin

- (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 36, 2135–2137.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschäpe, H., Tarr, P. I. & Karch, H. (2007). Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 73, 3144–3150.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G. & other authors. (2003). Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 41, 1351–1356.
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J.-M. & Alric, M. (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm Res* 29, 1444–1453.
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., Skerman, F. J. & Falkow, S. (1972). Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J Bacteriol* 109, 953–965.
- Bretschneider, G., Berberov, E. M. & Moxley, R. A. (2007). Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118, 229–238.
- Breuer, T., Benkel, D. H., Shapiro, R. L., Hall, W. N., Winnett, M. M., Linn, M. J., Neimann, J., Barrett, T. J., Dietrich, S. & other authors. (2001). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerging Infect Dis* 7, 977–982.
- Brewster, D. H., Brown, M. I., Robertson, D., Houghton, G. L., Bimson, J. & Sharp, J. C. (1994). An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* 112, 441–447.
- Brown, L. & Elliott, T. (1997). Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179, 656–662.

- Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. & Fach, P. (2010a). Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol* 142, 318–329.
- Bugarel, M., Beutin, L. & Fach, P. (2010b). Low-density macroarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (*nle* genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): a new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Appl Environ Microbiol* 76, 203–211.
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P. & Beutin, L. (2011). Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol* 11, 142.
- Buvens, G., Possé, B., De Schrijver, K., De Zutter, L., Lauwers, S. & Piérard, D. (2011). Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related hemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathog Dis* 8, 421–426.
- Byrne, C. M., Erol, I., Call, J. E., Kaspar, C. W., Buege, D. R., Hiemke, C. J., Fedorka-Cray, P. J., Benson, A. K., Wallace, F. M. & Luchansky, J. B. (2003). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from Downer and Healthy Dairy Cattle in the Upper Midwest Region of the United States. *Appl Environ Microbiol* 69, 4683–4688.
- Callaway, T. R., Anderson, R. C., Edrington, T. S., Genovese, K. J., Harvey, R. B., Poole, T. L. & Nisbet, D. J. (2004). Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. *Anim Health Res Rev* 5, 35–47.
- Callaway, T. R., Carr, M. A., Edrington, T. S., Anderson, R. C. & Nisbet, D. J. (2009). Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* 11, 67–79.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H. & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36, 289–311.

- Castanié-Cornet, M.-P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P. & Gutierrez, C. (2010). Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Res* 38, 3546–3554.
- CDC. (2000). Centers for Disease Control - Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds --- Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49, 911–3.
- CDC. (2006). Centers for Disease Control - Questions and Answers about *E. coli* O157:H7 Outbreak from Fresh Spinach.
- CDC. (2010). Centers for Disease Control - Multistate Outbreak of Human *E. coli* O145 Infections Linked to Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility.
- CDC. (2012). Centers for Disease Control - Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 infections associated with a correctional facility dairy - Colorado, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61, 149–152.
- Cebula, T. A., Payne, W. L. & Feng, P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33, 248–250.
- Chalmers, R. M., Aird, H. & Bolton, F. J. (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 124S–132S.
- Chang, J.-H., Chou, C.-C. & Li, C.-F. (2000). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiology* 17, 579–587.
- Chapman, P. A., Cerdán Malo, A. T., Ellin, M., Ashton, R. & 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.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L. & Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology* 6, 904–912.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J.P., Colombel, J.F., Darfeuille-Michaud, A. (2011). Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*, 121 (3), 966-75.

- Chen, Y., Sela, S., Gamburg, M., Pinto, R. & Weinberg, Z. G. (2005). Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Appl Environ Microbiol* 71, 5163–5170.
- Chinen, I., Epszteyn, S., Melamed, C. L., Aguerre, L., Martínez Espinosa, E., Motter, M. M., Baschkier, A., Manfredi, E., Miliwebsky, E. & Rivas, M. (2009). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol* 132, 167–171.
- Cloarec, S., Deschênes, G., Besson-Leaud, M., Casenave, C., Gambert, C., Guyot, C., Hermouet, Y., Romanet, P., Roy, C. & other authors. (1996). Epidemiology of acute post-diarrhea hemolytic-uremic syndrome in children in 4 French departments. *Arch Pediatr* 3, 1209–1214.
- Clough, H. E., Clancy, D. & French, N. P. (2009). Quantifying exposure to Vero-cytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in milk sold as pasteurized: A model-based approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 95–105.
- CNIEL. (2012). L'économie laitière en chiffres - édition 2012., CNIEL. Paris, France.
- Cobbaut, K., Berkvens, D., Houf, K., De Deken, R. & De Zutter, L. (2009). *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. *J Food Prot* 72, 1848–1853.
- Cobbold, R. N., Davis, M. A., Rice, D. H., Szymanski, M., Tarr, P. I., Besser, T. E. & Hancock, D. D. (2008). Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *J Food Prot* 71, 1023–1027.
- Cobbold, R. & Desmarchelier, P. (2002). Horizontal Transmission of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* within Groups of Dairy Calves. *Appl Environ Microbiol* 68, 4148–4152.
- Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P. M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A. S. & other authors. (1999). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med* 130, 202–209.
- Coia, J. (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. *International Journal of Food Microbiology* 66, 63–69.

- Collins, J. D. & Wall, P. G. (2004). Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. *Rev - Off Int Epizoot* 23, 685–700.
- Conedera, G., Dalvit, P., Martini, M., Galiero, G., Gramaglia, M., Goffredo, E., Loffredo, G., Morabito, S., Ottaviani, D. & other authors. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 67–73.
- Cookson, A. L., Taylor, S. C. S., Bennett, J., Thomson-Carter, F. & Attwood, G. T. (2006). Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *N Z Vet J* 54, 78–84.
- Cookson, A. L., Cooley, W. A. & Woodward, M. J. (2002). The role of type 1 and *curli fimbriae* of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* 292, 195–205.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B. & Karmali, M. A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 74, 2153–2160.
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A. & other authors. (2005). Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology* 110, 67–76.
- Cowden, J. M., Ahmed, S., Donaghy, M. & Riley, A. (2001). Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect* 126, 335–341.
- Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T. & Stuart, J. (1999). Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 286–288.
- Cransberg, K., Van den Kerkhof, J. H., Bänffer, J. R., Stijnen, C., Wernars, K., Van de Kar, N. C., Nauta, J. & Wolff, E. D. (1996). Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water? *Clin Nephrol* 46, 45–49.
- Craun, G. F., Calderon, R. L. & Craun, M. F. (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* 15, 243–262.

- Crepin, V. F., Girard, F., Schüller, S., Phillips, A. D., Mousnier, A. & Frankel, G. (2010). Dissecting the role of the Tir:Nck and Tir:IRTKS/IRSp53 signalling pathways in vivo. *Mol Microbiol* 75, 308–323.
- Croxen, M. A. & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8, 26–38.
- Crump, J. A., Sulka, A. C., Langer, A. J., Schaben, C., Crielly, A. S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G. & other authors. (2002). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* 347, 555–560.
- Cull, C. A., Paddock, Z. D., Nagaraja, T. G., Bello, N. M., Babcock, A. H. & Renter, D. G. (2012). Efficacy of a vaccine and a direct-fed microbial against fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a randomized pen-level field trial of commercial feedlot cattle. *Vaccine* 30, 6210–6215.
- D’Amico, D. J., Druart, M. J. & Donnelly, C. W. (2010). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J Food Prot* 73, 2217–2224.
- D’Aoust, J. ., Park, C. ., Szabo, R. . & Todd, E. C. . (1988). Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 71, 3226–3230.
- Davis, M. A., Cloud-Hansen, K. A., Carpenter, J. & Hovde, C. J. (2005). *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol* 71, 6816–6822.
- De Sablet, T., Bertin, Y., Vareille, M., Girardeau, J.-P., Garrivier, A., Gobert, A. P. & Martin, C. (2008). Differential expression of stx2 variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology* 154, 176–186.
- De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, C., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D., Dierick, K. & other authors. (2008). Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance* 13, article 8041.
- De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J Gen Microbiol* 138, 571–578.

- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P. A., Hubert, B. & Loirat, C. (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Société de Néphrologie Pédiatrique. *Epidemiol Infect* 124, 215–220.
- Delbes, C., Miszczucha, S. ., Ganet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Pochet, S., Thevenot, D. & Montel, M. C. (2013). Behaviour of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *International Journal of Food Microbiology* 160, 212-218.
- Denis, C., Gueguen, M., Henry, E. & Levert, D. (2001). New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Le Lait* 81, 365–379.
- Dewanti, R. & Wong, A. C. L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 26, 147–164.
- DGAL. (2010). Bilan 2009 des plans de surveillance et de controle mis en oeuvre par la DGAL - Plan de surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC (VTEC) des viandes hachées et des fromages au lait cru pour l'année 2009 - p51-53. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire - France.
- Dineen, S. S., Takeuchi, K., Soudah, J. E. & Boor, K. J. (1998). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J Food Prot* 61, 1602–1608.
- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J. & Kaper, J. B. (1993). The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 92, 1418–1424.
- Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol* 94 Suppl, 94S–103S.
- Duffy, G., Whiting, R. C. & Sheridan, J. J. (1999). The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 16, 299–307.
- Dunière, L., Gleizal, A., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I. & Thévenot-Sergentet, D. (2011). Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally contaminated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants. *Appl Environ Microbiol* 77, 8696–8704.

- Dutta, T. K., Roychoudhury, P., Bandyopadhyay, S., Wani, S. A. & Hussain, I. (2011). Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. *Indian J Med Res* 133, 541–545.
- Dziva, F., Vlisidou, I., Crepin, V. F., Wallis, T. S., Frankel, G. & Stevens, M. P. (2007). Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Veterinary Microbiology* 123, 254–261.
- Eck, A. & Gillis, J.-C. (1997). *Le fromage (3^e Ed.)*, Tec & Doc - Lavoisier.
- EFSA. (2007). EFSA (European Food Safety Authority) - Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC. *The EFSA Journal* 579, 1–61.
- EFSA. (2009). EFSA (European Food Safety Authority) - The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2007. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf>.
- EFSA. (2010). EFSA (European Food Safety Authority) - The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* 8, 1496.
- EFSA. (2011). EFSA (European Food Safety Authority) - Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: taking stock. *The EFSA Journal* 9, 2390.
- Elashoff, J. D., Reedy, T. J. & Meyer, J. H. (1982). Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology* 83, 1306–1312.
- Elhadidy, M. & Mohammed, M. A. (2012). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Raw-Milk Cheese in Egypt: Prevalence, Molecular Characterization and Survival to Stress Conditions. *Lett Appl Microbiol*.
- Ellis-Iversen, J., Smith, R. P., Van Winden, S., Paiba, G. A., Watson, E., Snow, L. C. & Cook, A. J. C. (2008). Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle--a randomised controlled trial. *Vet Res* 39, 3.
- el-Ziney, M. G. & Debevere, J. M. (1998). The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *J Food Prot* 61, 1275–1280.

- Enache, E., Mathusa, E. C., Elliott, P. H., Black, D. G., Chen, Y., Scott, V. N. & Schaffner, D. W. (2011). Thermal resistance parameters for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in apple juice. *J Food Prot* 74, 1231–1237.
- Erickson, M. C. & Doyle, M. P. (2007). Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot* 70, 2426–2449.
- Eriksson, E., Aspan, A., Gunnarsson, A. & Vågsholm, I. (2005). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol Infect* 133, 349–358.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. & Vernozy-Rozand, C. (2006a). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* 134, 143–146.
- Espié, E., Grimont, F., Vaillant, V., Montet, M. P., Carle, I., Bavai, C., De Valk, H. & Vernozy-Rozand, C. (2006b). O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clin Microbiol Infect* 12, 992–998.
- Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., Capek, I. & De Valk, H. (2006c). Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005. In Abstract of the 6th International Symposium on Shigatoxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. ed. Sofronidis, J. Melbourne, Australia, 2006. Oct. 30–Nov. 1. West Leederville, WA: Cambridge Publ.
- Espié, E., Grimont, F., Mariani-Kurkdjian, P., Bouvet, P., Haeghebaert, S., Filliol, I., Loirat, C., Decludt, B., Minh, N. N. T. & other authors. (2008). Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. *Pediatr Infect Dis J* 27, 595–601.
- Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J.-M., Alric, M. & Blanquet-Diot, S. (2011). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl Environ Microbiol* 77, 1127–1131.
- Euzéby, J. P. (2011). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.

- Evans, J., Chalmers, R. M., Chart, H., Salmon, R. L., Kench, S. M., Coleman, T. J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P. & other authors. (2000). Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Eur J Epidemiol* 16, 885–889.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F. & Grout, J. (2001). Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J Appl Microbiol* 90, 809–818.
- Faith, N. G., Shere, J. A., Brosch, R., Arnold, K. W., Ansay, S. E., Lee, M. S., Luchansky, J. B. & Kaspar, C. W. (1996). Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62, 1519–1525.
- Farrag, S. A., El-Gazzar, F. E. & Marth, E. H. (1992). Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 or *Yersinia enterocolitica* at 4 or 7°C in raw milk inoculated with a commercial culture of lactic acid bacteria. *Michwissenschaft* 47, 149–151.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K. & other authors. (2012). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol*.
- Fenlon, D. R. & Wilson, J. (2000). Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol* 30, 118–121.
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2, 898–907.
- Franz, E., Van Hoek, A. H. A. M., Bouw, E. & Aarts, H. J. M. (2011). Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Appl Environ Microbiol* 77, 8088–8096.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. & Rozand, C. V. (2006). Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol* 117, 180–191.
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M. L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A. & Vernozy-Rozand, C. (2007a). Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol* 102, 89–99.

- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M. L., Dothal, M. & Vernozy-Rozand, C. (2007b). Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Lett Appl Microbiol* 45, 55–61.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C. & Vernozy-Rozand, C. (2008a). Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet Microbiol* 132, 1–18.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M. L., Mallen, B., Dothal, M., Gleizal, A. & Vernozy-Rozand, C. (2008b). Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *J Appl Microbiol* 104, 296–304.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Beutin, L., Gleizal, A., Trevisan, D., Quetin, P., Jocteur-Monrozier, L. & Rozand, C. (2010). Survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in alpine pasture grasslands. *J Appl Microbiol* 108, 1332–1343.
- Friedman, M. S., Roels, T., Koehler, J. E., Feldman, L., Bibb, W. F. & Blake, P. (1999). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin Infect Dis* 29, 298–303.
- Friesema, I. H. M., VAN DE Kastele, J., DE Jager, C. M., Heuvelink, A. E. & VAN Pelt, W. (2010). Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. *Epidemiol Infect* 1–7.
- Fukushima, H., Hoshina, K. & Gomyoda, M. (1999). Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 65, 5177–5181.
- Gagliardi, J. V. & Karns, J. S. (2000). Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl Environ Microbiol* 66, 877–883.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120, 51–70.
- Garmendia, J., Phillips, A. D., Carlier, M.-F., Chong, Y., Schüller, S., Marches, O., Dahan, S., Oswald, E., Shaw, R. K. & other authors. (2004). TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* 6, 1167–1183.

- Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73, 2573–2585.
- Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenlann, R. E. & Oechslin, R. (1955). [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr* 85, 905–909.
- Gautam, R., Bani-Yaghoub, M., Neill, W. H., Döpfer, D., Kaspar, C. & Ivanek, R. (2011). Modeling the effect of seasonal variation in ambient temperature on the transmission dynamics of a pathogen with a free-living stage: example of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Prev Vet Med* 102, 10–21.
- Geue, L., Klare, S., Schnick, C., Mintel, B., Meyer, K. & Conraths, F. J. (2009). Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl Environ Microbiol* 75, 6947–6953.
- Ghebru, H. (1988). Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. *Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie*. Nantes.
- Glass, K. A., Loeffelholz, J. M., Ford, J. P. & Doyle, M. P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol* 58, 2513–2516.
- Glass, K. A., Kaufman, K. M. & Johnson, E. A. (1998). Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30 degrees C. *J Food Prot* 61, 290–294.
- Govaris, A., Papageorgiou, D. K. & Papatheodorou, K. (2002). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses. *J Food Prot* 65, 609–615.
- Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., FitzGerald, M., Godfrey, P., Haas, B. J., Murphy, C. I. & other authors. (2012). Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3065–3070.
- Griffin, P. M. & 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.

- Grimont, P. a. D. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et maladies infectieuses* 17, 6–10.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 85, E45–62.
- Haeghebaert, S., Vaillant, V., Espié, E., Bouvet, P. & Grimont, F. (2003). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, 2001. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 20, 89–91.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M. & Rice, D. (2001). The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 66, 71–78.
- Hancock, D. D., Besser, T. E., Rice, D. H., Herriott, D. E. & Tarr, P. I. (1997). A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* 118, 193–195.
- Hancock, D. D., Besser, T. E., Rice, D. H., Ebel, E. D., Herriott, D. E. & Carpenter, L. V. (1998). Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* 35, 11–19.
- Hassan, A. N. & Frank, J. F. (2000). Heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Egyptian Journal of Dairy Science* 28, 129–137.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 341–346.
- Heuvelink, A. E., Van den Biggelaar, F. L., Zwartkuis-Nahuis, J., Herbes, R. G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W. J., Monnens, L. A. & De Boer, E. (1998). Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol* 36, 3480–3487.
- Hilborn, E. D., Mshar, P. A., Fiorentino, T. R., Dembek, Z. F., Barrett, T. J., Howard, R. T. & Cartter, M. L. (2000). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect* 124, 31–36.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. & Cliver, D. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol Lett* 178, 251–257.

- Holme, R. (2003). Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol* 47, 1–6.
- Hong, W., Wu, Y. E., Fu, X. & Chang, Z. (2012). Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. *Trends Microbiol* 20, 328–335.
- Howie, H., Mukerjee, A., Cowden, J., Leith, J. & Reid, T. (2003). Investigation of an outbreak of *Escherichia coli* O157 infection caused by environmental exposure at a scout camp. *Epidemiol Infect* 131, 1063–1069.
- Hrudey, S. E., Payment, P., Huck, P. M., Gillham, R. W. & Hrudey, E. J. (2003). A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci Technol* 47, 7–14.
- Hudson, L. M. [1., Chen, J. [1., Hill, A. R. [1. & Griffiths, M. W. [1. (1997). Bioluminescence: A Rapid Indicator of *Escherichia Coli* O157:H7 in Selected Yogurt and Cheese Varieties. *Journal of Food Protection* 60, 891–897.
- Hughes, L. A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T. R., Jones, R. C., Lahuerta-Marin, A., McNiffe, K., Norman, D. & other authors. (2009). Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes eae, stx1 and stx2 in wild bird populations. *Epidemiol Infect* 137, 1574–1582.
- Hussein, H. S. (2007). Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* 85, E63–72.
- Hussein, H. S. & Sakuma, T. (2005a). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* 88, 450–465.
- Hussein, H. S. & Sakuma, T. (2005b). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. *J Food Prot* 68, 199–207.
- ICMSF. (1996). *Microbiological specifications of food pathogens*. In *Microorganisms in Foods vol. 5.*, Blackie academic and professional Publ. London: Springer.
- Ihekweazu, C., Barlow, M., Roberts, S., Christensen, H., Guttridge, B., Lewis, D. & Paynter, S. (2006). Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro Surveill* 11, 128–130.
- Ihekweazu, C., Carroll, K., Adak, B., Smith, G., Pritchard, G. C., Gillespie, I. A., Verlander, N. Q., Harvey-Vince, L., Reacher, M. & other authors. (2012). Large outbreak of

- verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in visitors to a petting farm in South East England, 2009. *Epidemiol Infect* 140, 1400–1413.
- Imamovic, L. & Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. *PLoS ONE* 7, e32393.
- InVS. (2007). INVS (Institut de Veille Sanitaire) Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, nord-ouest de la France, octobre-décembre 2005. Available at http://www.invs.sante.fr/publications/2008/epidemie_e_coli_camembert/rapport_epidemie_stec.pdf.
- InVS. (2011). Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique dans le Nord-Pas-de-Calais et la Picardie. Situation au 12 juillet 2011 (<http://www.invs.sante.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Nord/2011/juillet-2011/Cas-groupes-de-syndrome-hemolytique-et-uremique-dans-le-Nord-Pas-de-Calais-et-la-Picardie.-Situation-au-12-juillet-2011>).
- InVS. (2012). Episode de cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) et de diarrhées sanglantes survenus dans le Sud-Ouest, Juin 2012 (<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Syndrome-hemolytique-et-uremique/Actualites>).
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P. & Jiang, X. (2004). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J Food Prot* 67, 1365–1370.
- Ismaili, A., Philpott, D. J., Dytoc, M. T. & Sherman, P. M. (1995). Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 3316–3326.
- Isolini, D., Grand, M. & Glättli, H. (1990). Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 19, 57–59.
- Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Johnson, R. P., Odorico, V. G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J. B., Welch, M. K. & Khakhria, R. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect* 120, 17–20.

- Jacob, M. E., Almes, K. M., Shi, X., Sargeant, J. M. & Nagaraja, T. G. (2011). *Escherichia coli* O157:H7 genetic diversity in bovine fecal samples. *J Food Prot* 74, 1186–1188.
- Jacob, M. E., Callaway, T. R. & Nagaraja, T. G. (2009). Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6, 785–792.
- Janion, C. (2001). Some aspects of the SOS response system--a critical survey. *Acta Biochim Pol* 48, 599–610.
- Jarvis, K. G. & Kaper, J. B. (1996). Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64, 4826–4829.
- Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D. & Tarr, P. I. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 188, 719–729.
- Jerse, A. E., Gicquelais, K. G. & Kaper, J. B. (1991). Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 59, 3869–3875.
- Jiang, X., Morgan, J. & Doyle, M. P. (2002). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* 68, 2605–2609.
- Johannes, L. & Römer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 8, 105–116.
- Johnson, K. E., Thorpe, C. M. & Sears, C. L. (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 43, 1587–1595.
- Jokinen, C. C., Schreier, H., Mauro, W., Taboada, E., Isaac-Renton, J. L., Topp, E., Edge, T., Thomas, J. E. & Gannon, V. P. J. (2010). The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J Water Health* 8, 374–386.
- Jonsson, M. E., Aspán, A., Eriksson, E. & Vågsholm, I. (2001). Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *Int J Food Microbiol* 66, 55–61.

- Jordan, K. N., Oxford, L. & O'Byrne, C. P. (1999a). Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 65, 3048–3055.
- Jordan, K. N. & Maher, M. M. (2006). Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 by conventional plating techniques. *J Food Prot* 69, 689–692.
- Jordan, S. L., Glover, J., Malcolm, L., Thomson-Carter, F. M., Booth, I. R. & Park, S. F. (1999b). Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Appl Environ Microbiol* 65, 1308–1311.
- Judge, N. A., Mason, H. S. & O'Brien, A. D. (2004). Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun* 72, 168–175.
- Juneja, V. K. & Marmer, B. S. (1999). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7:D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. *Food research international* 32, 23–28.
- Jung, I. L. & Kim, I. G. (2003). Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 22846–22852.
- Kailasan Vanaja, S., Bergholz, T. M. & Whittam, T. S. (2009). Characterization of the *Escherichia coli* O157:H7 Sakai GadE regulon. *J Bacteriol* 191, 1868–1877.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140.
- Van de Kar, N. C., Roelofs, H. G., Muytjens, H. L., Tolboom, J. J., Roth, B., Proesmans, W., Reitsma-Bierens, W. C., Wolff, E. D., Karmali, M. A. & other authors. (1996). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe. *Eur J Pediatr* 155, 592–595.
- Karch, H., Meyer, T., Rüssmann, H. & Heesemann, J. (1992). Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 60, 3464–3467.
- Karch, H. & Bielaszewska, M. (2001). Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H- Strains: Epidemiology, Phenotypic and Molecular Characteristics, and Microbiological Diagnosis. *J Clin Microbiol* 39, 2043–2049.

- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C. & Steele, B. T. (1983). *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* 2, 1299–1300.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. & Kaper, J. B. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 41, 4930–4940.
- Karmali, M. A., Gannon, V. & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140, 360–370.
- Keene, W. E., McAnulty, J. M., Hoesly, F. C., Williams, L. P., Jr, Hedberg, K., Oxman, G. L., Barrett, T. J., Pfaller, M. A. & Fleming, D. W. (1994). A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331, 579–584.
- Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Lombard, J. E. & Koprak, C. A. (2011). Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* Virulence Factors in Bulk Tank Milk and In-Line Filters from U.S. Dairies. *Journal of Food Protection* 74, 759–768.
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H. & Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 76, 5088–5096.
- Khanna, R., Waechter, L., Sargeant, J., Clark, W. F. & Garg, A. X. (2008). Environmental prevention of human disease from verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Nephrol Dial Transplant* 23, 1819–1822.
- King, L. A., Espié, E., Haeghebaert, S., Grimont, F., Mariani-Kurkdjian, P., Filliol-Toutain, I., Bingen, E., Weil, F.-X., Loirat, C. & other authors. (2009a). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de 15 ans et moins en France, 1996-2007. <http://www.invs.sante.fr/beh/2009/14/index.htm#1>.
- King, L. A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Grimont, F., Pihier, N., Devalk, H., Perret, F. & other authors. (2009b). Community-wide outbreak

- of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol Infect* 137, 889–896.
- King, L. A., Filliol-Toutain, I., Mariani-Kurkidjian, P., Vaillant, V., Vernozy-Rozand, C., Ganet, S., Pihier, N., Niaudet, P. & De Valk, H. (2010a). Family outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O123:H-, France, 2009. *Emerging Infect Dis* 16, 1491–1493.
- King, T., Lucchini, S., Hinton, J. C. D. & Gobius, K. (2010b). Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Appl Environ Microbiol* 76, 6514–6528.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. I. & Stavric, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18, 775–779.
- Koseki, S., Mizuno, Y. & Sotome, I. (2011). Modeling of Pathogen Survival during Simulated Gastric Digestion. *Appl Environ Microbiol* 77, 1021–1032.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21, 805–815.
- Kovacs, M. J., Roddy, J., Grégoire, S., Cameron, W., Eidus, L. & Drouin, J. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* 88, 177–179.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. & Hovde, C. J. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 34, 431–433.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. & Hovde, C. J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* 35, 892–899.
- Kudva, I. T., Blanch, K. & Hovde, C. J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* 64, 3166–3174.
- Kuhnert, P., Dubosson, C. R., Roesch, M., Homfeld, E., Doherr, M. G. & Blum, J. W. (2005). Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Vet Microbiol* 109, 37–45.

- L'Abée-Lund, T. M., Jørgensen, H. J., O'Sullivan, K., Bohlin, J., Ligård, G., Granum, P. E. & Lindbäck, T. (2012). The highly virulent 2006 Norwegian EHEC O103:H25 outbreak strain is related to the 2011 German O104:H4 outbreak strain. *PLoS ONE* 7, e31413.
- La Ragione, R. M., Best, A., Woodward, M. J. & Wales, A. D. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol Rev* 33, 394–410.
- Lahti, E., Ruoho, O., Rantala, L., Hänninen, M.-L. & Honkanen-Buzalski, T. (2003). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. *Appl Environ Microbiol* 69, 554–561.
- Large, T. M., Walk, S. T. & Whittam, T. S. (2005). Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71, 2493–2500.
- Law, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 88, 729–745.
- Lee, K.-I., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y. & Kumagai, S. (2012). *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* Enhance the Growth and Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 under Mild Acidic Conditions. *Journal of Food Science* 77, M102–M107.
- Leistner, L. (1995). Principles and applications of hurdle technology. G.W. Gould (Ed.), *New Methods of Food Preservation*, Blackie Academic and Professional, London (1995), pp. 1–21.
- LeJeune, J. T. & Wetzel, A. N. (2007). Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J Anim Sci* 85, E73–80.
- LeJeune, J. T., Besser, T. E. & Hancock, D. D. (2001). Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* 67, 3053–3057.
- LeJeune, J. T., Hancock, D. D. & Besser, T. E. (2006). Sensitivity of *Escherichia coli* O157 detection in bovine feces assessed by broth enrichment followed by immunomagnetic separation and direct plating methodologies. *J Clin Microbiol* 44, 872–875.
- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L. P., Kontominas, M. G. & Samelis, J. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 degrees C. *Food Microbiol* 23, 268–276.

- Lenoir, J. (1962). CR Acad Agric 48, 160–169.
- Lenoir, J., Lamberet, G. & Schmidt, J. L. (1983). L'elaboration d'un fromage: l'exemple du camembert. *Pour la Science* 30–42.
- Leuschner, R. G. K. & Boughtflower, M. P. (2002). Laboratory-Scale Preparation of Soft Cheese Artificially Contaminated with Low Levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. *Journal of Food Protection* 65, 508–514.
- Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155, 377–389.
- Levine, M. M. & Edelman, R. (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 6, 31–51.
- Liebana, E., Smith, R. P., Batchelor, M., McLaren, I., Cassar, C., Clifton-Hadley, F. A. & Paiba, G. A. (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J Clin Microbiol* 43, 898–902.
- Lin, A., Sultan, O., Lau, H. K., Wong, E., Hartman, G. & Lauzon, C. R. (2011). O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiology* 28, 478–483.
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 4097–4104.
- Lindblad, M. & Lindqvist, R. (2010). Modelling time to growth of *Escherichia coli* as a function of water activity and undissociated lactic acid. *Lett Appl Microbiol* 50, 308–313.
- Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., De Grandis, S. & Karmali, M. (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 262, 8834–8839.
- Lira, W. M., Macedo, C. & Marin, J. M. (2004). The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* 97, 861–866.
- Loneragan, G. H. & Brashears, M. M. (2005). Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. *Meat Science* 71, 72–78.

- Luquet, F. M. (1985). *Laits et produits laitiers - vache.brebis.chevre.* , Sciences et techniques agro-alimentaires, Tec & Doc - Lavoisier. Paris, France.
- Lynch, M. ., O'Connor, L., Fox, E. ., Jordan, K. & Murphy, M. (2012). Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O111, O26, O103, O145 in Irish dairy cattle and raw milk: prevalence and epidemiology of emergent stains. *Zoonoses and Public Health* 59, 264–271.
- Lynn, T. V., Hancock, D. D., Besser, T. E., Harrison, J. H., Rice, D. H., Stewart, N. T. & Rowan, L. (1998). The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J Dairy Sci* 81, 1102–1108.
- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2003). GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 49, 1309–1320.
- Mackay, I. M. (2007). Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterisation. Horizon Scientific Press.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E. & Auvray, F. (2010). Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J Appl Microbiol* 109, 1696–1705.
- Madic, J., Vingadassalon, N., De Garam, C. P., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E. & Auvray, F. (2011). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 77, 2035–2041.
- Mahaut, M., Jeantet, R. & Brulé, G. (2000). Initiation à la technologie fromagère. TEC & DOC.
- Maher, M. M., Jordan, K. N., Upton, M. E. & Coffey, A. (2001). Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J Appl Microbiol* 90, 201–207.
- Mainil, J. G. & Daube, G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* 98, 1332–1344.

- Mannix, M., Whyte, D., McNamara, E., O Connell, N., Fitzgerald, R., Mahony, M., Prendiville, T., Norris, T., Curtin, A. & other authors. (2007). Large outbreak of *E. coli* O157 in 2005, Ireland. *Euro Surveill* 12.
- Mao, Y., Doyle, M. P. & Chen, J. (2006). Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol* 42, 642–647.
- Marouani-Gadri, N., Augier, G. & Carpentier, B. (2009). Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 133, 62–67.
- Martin, A. & Beutin, L. (2011). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int J Food Microbiol* 146, 99–104.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S. J. & Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153, 192–202.
- Matthews, K. R., Murdough, P. A. & Bramley, A. J. (1997). Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 82, 197–203.
- Matthews, L., Low, J. C., Gally, D. L., Pearce, M. C., Mellor, D. J., Heesterbeek, J. A. P., Chase-Topping, M., Naylor, S. W., Shaw, D. J. & other authors. (2006). Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 547–552.
- Mayeux, J. V., Sandine, W. E. & Elliker, P. R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J Dairy Sci* 45, 655–656.
- McGee, P., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., Earley, B., Kelly, G. & Leonard, N. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *J Appl Microbiol* 93, 706–713.
- McGee, P., Scott, L., Sheridan, J. J., Earley, B. & Leonard, N. (2004). Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. *J Food Prot* 67, 2651–2656.

- McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B. & Preston, T. (2002). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep* 28, 6–8.
- McNeilly, T. N., Naylor, S. W., Mahajan, A., Mitchell, M. C., McAteer, S., Deane, D., Smith, D. G. E., Low, J. C., Gally, D. L. & Huntley, J. F. (2008). *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infect Immun* 76, 2594–2602.
- McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J. C., Smith, D. G. E., Huntley, J. F., Mahajan, A. & Gally, D. L. (2010). Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine* 28, 1422–1428.
- McWilliam Leitch, E. C. & Stewart, C. S. (2002a). *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to L-lactate than to D-lactate. *Appl Environ Microbiol* 68, 4676–4678.
- McWilliam Leitch, E. C. & Stewart, C. S. (2002b). Susceptibility of *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates to lactate. *Lett Appl Microbiol* 35, 176–180.
- Mechie, S. C., Chapman, P. A. & Siddons, C. A. (1997). A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect* 118, 17–25.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y. & other authors. (2011). Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE* 6, e22751.
- Meyer-Broseta, S., Bastian, S. N., Arné, P. D., Cerf, O. & Sanaa, M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* 203, 347–361.
- Michel, P., Wilson, J. B., Martin, S. W., Clarke, R. C., McEwen, S. A. & Gyles, C. L. (1999). Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiol Infect* 122, 193–200.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A. & Yanagawa, H. (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in

- Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 150, 787–796.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. & Huis in 't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA Alternatives to laboratory animals* 23, 197–209.
- Le Minor, L., Popoff, M. Y. & Bockemühl, J. (1990). Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 141, 1173–1177.
- Miszczycha, S. D., Ganet, S., Dunière, L., Rozand, C., Loukiadis, E. & Thevenot-Sergentet, D. (2012). Novel Real Time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat. *Journal of Food Protection* 75, 1373–1381.
- Miszczycha, S. D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M.-C. & Thevenot-Sergentet, D. (2013). Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses. *Appl Environ Microbiol.* 79 (1), 150-158.
- Monday, S. R., Whittam, T. S. & Feng, P. C. (2001). Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 184, 918–921.
- Montet, M. P., Jamet, E., Ganet, S., Dizin, M., Miszczycha, S., Dunière, L., Thevenot, D. & Verzozy-Rozand, C. (2009). Growth and Survival of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains during the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. *Int J Microbiol* 2009, 653481.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E. & Caprioli, A. (1998). Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 36, 840–842.
- Mørretrø, T., Heir, E., Mo, K. R., Habimana, O., Abdelgani, A. & Langsrud, S. (2010). Factors affecting survival of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. *Int J Food Microbiol* 138, 71–77.
- Morgan, D., Newman, C. P., Hutchinson, D. N., Walker, A. M., Rowe, B. & Majid, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* 111, 181–187.

- Mossel, D. A., Vega, C. L. & Put, H. M. (1975). Further studies on the suitability of various media containing antibacterial antibiotics for the enumeration of moulds in food and food environments. *J Appl Bacteriol* 39, 15–22.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. & Hengge-Aronis, R. (1996a). The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J* 15, 1333–1339.
- Muffler, A., Fischer, D. & Hengge-Aronis, R. (1996b). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 10, 1143–1151.
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R. & Chikindas, M. L. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 44, 255–261.
- Nangaku, M., Nishi, H. & Fujita, T. (2007). Pathogenesis and prognosis of thrombotic microangiopathy. *Clin Exp Nephrol* 11, 107–114.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A. & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34, 476–495.
- Naylor, S. W., Gally, D. L. & Low, J. C. (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295, 419–441.
- Naylor, S. W., Flockhart, A., Nart, P., Smith, D. G. E., Huntley, J., Gally, D. L. & Low, J. C. (2007). Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Appl Environ Microbiol* 73, 3765–3767.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour Technol* 96, 135–143.
- Nielsen, E. M. & Andersen, M. T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* 41, 2884–2893.
- Nielsen, E. M., Skov, M. N., Madsen, J. J., Lodal, J., Jespersen, J. B. & Baggesen, D. L. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl Environ Microbiol* 70, 6944–6947.

- Nooitgedagt, A. . & Hartog, B. . (1988). A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 42, 57–72.
- O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., Thompson, M. R. & Formal, S. B. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146, 763–769.
- O'Brien, S. J., Adak, G. K. & Gilham, C. (2001a). Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerging Infect Dis* 7, 1049–1051.
- O'Brien, S. J., Murdoch, P. S., Riley, A. H., King, I., Barr, M., Murdoch, S., Greig, A., Main, R., Reilly, W. J. & Thomson-Carter, F. M. (2001b). A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H-phage type 8 in hospital. *J Hosp Infect* 49, 167–172.
- Ogden, I. D., Hepburn, N. F., MacRae, M., Strachan, N. J. C., Fenlon, D. R., Rusbridge, S. M. & Pennington, T. H. (2002). Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol* 34, 100–104.
- Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J.-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K. & other authors. (2007a). Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol* 8, R138.
- Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I. & other authors. (2007b). TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. *Infect Immun* 75, 604–612.
- Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Cid, D., González, E. A., Blanco, J. & De la Fuente, R. (2003). Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol Infect* 130, 313–321.
- Orden, J. A., Cortés, C., Horcajo, P., De la Fuente, R., Blanco, J. E., Mora, A., López, C., Blanco, J., Contreras, A. & other authors. (2008). A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Veterinary Microbiology* 132, 428–434.

- 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 J Infect Dis* 26, 675–684.
- Osborn, M. J., Rosen, S. M., Rothfield, L., Zeleznick, L. D. & Horecker, B. L. (1964). Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. *Science* 145, 783–789.
- Paton, A. W., Ratcliff, R. M., Doyle, R. M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J. A. & Paton, J. C. (1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 34, 1622–1627.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. & Paton, J. C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 69, 6999–7009.
- Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11, 450–479.
- Paunio, M., Pebody, R., Keskimäki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E. & Leinikki, P. (1999). Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 122, 1–5.
- Pearce, M. C., Evans, J., McKendrick, I. J., Smith, A. W., Knight, H. I., Mellor, D. J., Woolhouse, M. E. J., Gunn, G. J. & Low, J. C. (2006). Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl Environ Microbiol* 72, 653–659.
- Peng, S., Hoffmann, W., Bockelmann, W., Hummerjohann, J., Stephan, R. & Hammer, P. (2012). Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese. *J Dairy Sci*.
- Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J. & Stephan, R. (2011). An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *J Food Prot* 74, 849–864.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. & Fach, P. (2005). Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 98, 1162–1168.

- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. & Fach, P. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* 18, 185–192.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J. & other authors. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529–533.
- Peterson, R. E., Klopfenstein, T. J., Moxley, R. A., Erickson, G. E., Hinkley, S., Bretschneider, G., Berberov, E. M., Rogan, D. & Smith, D. R. (2007a). Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. *J Food Prot* 70, 2568–2577.
- Peterson, R. E., Klopfenstein, T. J., Moxley, R. A., Erickson, G. E., Hinkley, S., Rogan, D. & Smith, D. R. (2007b). Efficacy of dose regimen and observation of herd immunity from a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for feedlot cattle. *J Food Prot* 70, 2561–2567.
- Picozzi, C., Volponi, G., Vigentini, I., Grassi, S. & Foschino, R. (2012). Assessment of transduction of *Escherichia coli* Stx2-encoding phage in dairy process conditions. *Int J Food Microbiol* 153, 388–394.
- Polifroni, R., Etcheverría, A. I., Sanz, M. E., Cepeda, R. E., Krüger, A., Lucchesi, P. M. A., Fernández, D., Parma, A. E. & Padola, N. L. (2012). Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the environment of a dairy farm. *Curr Microbiol* 65, 337–343.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M. & Herman, L. (2007). Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 158, 591–599.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M. & Herman, L. (2008). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol Lett* 282, 124–131.
- 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.
- Priest, F. G. & Barker, M. (2010). Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 828–833.
- Quilliam, R. S., Chalmers, R. M., Williams, A. P., Chart, H., Willshaw, G. A., Kench, S. M., Edwards-Jones, G., Evans, J., Thomas, D. R. & other authors. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with *Escherichia coli* O157 in a farming population. *Zoonoses Public Health* 59, 83–88.
- Rahn, K., Renwick, S. A., Johnson, R. P., Wilson, J. B., Clarke, R. C., Alves, D., McEWEN, S., Lior, H. & Spika, J. (1997). Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology & Infection* 119, 251–259.
- Ramet, J. P. (1985). La fromagerie, les variétés de fromages du bassin méditerranéen. FAO. Rome, Italie.
- Ramos Moreno, A. C., Cabilio Guth, B. E. & Baquerizo Martinez, M. (2006). Can the *fliC* PCR-restriction fragment length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? *J Clin Microbiol* 44, 1453–1458.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A. & Griffiths, M. W. (1998). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J Dairy Sci* 81, 1810–1817.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. & Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infect Dis* 11, 603–609.
- Raynaud, S., Vernozy-Rozand, C., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., poutrel, B., Heuchel, V. & Chatelin, Y. (2005). Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins Français. *12èmes Rencontres Recherche Ruminants* 379–382.
- Reid, S. D., Selander, R. K. & Whittam, T. S. (1999). Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 153–160.

- Reida, P., Wolff, M., Pöhls, H. W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksić, S., Karch, H. & Bockemühl, J. (1994). An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol* 281, 534–543.
- Reitsma, C. J. & Henning, D. R. (1996). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 59, 460–464.
- Repoila, F., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2003). Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol Microbiol* 48, 855–861.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. & Alonso, J. M. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol* 107, 212–217.
- Rice, E. W., Johnson, C. H., Dunnigan, M. E. & Reasoner, D. J. (1993). Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 59, 4347–4349.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M. & other authors. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308, 681–685.
- Rivas, L., Dykes, G. A. & Fegan, N. (2007). A comparative study of biofilm formation by Shiga toxicogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *J Microbiol Methods* 69, 44–51.
- Roberts, C. L., Mshar, P. A., Cartter, M. L., Hadler, J. L., Sosin, D. M., Hayes, P. S. & Barrett, T. J. (1995). The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157.H7. *Epidemiol Infect* 115, 447–454.
- Roe, A. J., McLaggan, D., Davidson, I., O’Byrne, C. & Booth, I. R. (1998). Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J Bacteriol* 180, 767–772.
- Rostagno, M. H. (2009). Can Stress in Farm Animals Increase Food Safety Risk? *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 767–776.

- Rowe, M. T. & Kirk, R. (1999). An investigation into the phenomenon of cross-protection in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 16, 157–164.
- Rozema, E. A., Stephens, T. P., Bach, S. J., Okine, E. K., Johnson, R. P., Stanford, K. & McAllister, T. A. (2009). Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* 72, 241–250.
- Rugbjerg, H., Nielsen, E. M. & Andersen, J. S. (2003). Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 58, 101–113.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181, 1753–1754.
- Ryan, C. A., Tauxe, R. V., Hisek, G. W., Wells, J. G., Stoesz, P. A., McFadden, H. W., Jr, Smith, P. W., Wright, G. F. & Blake, P. A. (1986). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* 154, 631–638.
- Ryu, J.-H. & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71, 247–254.
- Ryu, J.-H., Kim, H., Frank, J. F. & Beuchat, L. R. (2004). Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett Appl Microbiol* 39, 359–362.
- Salter, M. A., Ratkowsky, D. A., Ross, T. & McMeekin, T. A. (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *Int J Food Microbiol* 61, 159–167.
- Sargeant, J. M., Amezcua, M. R., Rajic, A. & Waddell, L. (2007). Pre-harvest interventions to reduce the shedding of *E. coli* O157 in the faeces of weaned domestic ruminants: a systematic review. *Zoonoses Public Health* 54, 260–277.
- Sarimehmetoglu, B., Aksoy, M. H., Ayaz, N. D., Ayaz, Y., Kuplulu, O. & Kaplan, Y. Z. (2009). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control* 20, 357–361.

- Savoie, F., Rozand, C., Bouvier, M., Gleizal, A. & Thevenot, D. (2011). Optimized enrichment for the detection of *Escherichia coli* O26 in French raw milk cheeses. *Lett Appl Microbiol* 52, 603–609.
- Scaletsky, I. C. A., Aranda, K. R. S., Souza, T. B. & Silva, N. P. (2010). Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol* 48, 302–306.
- Scavia, G., Edefonti, A., Vidal, E., Emma, F., Pecoraco, C., Amore, A., Brigotti, M., Caprioli, A. & Verrina, E. (2012). Surveillance of pediatric hemolytic uremic syndrome (HUS) in Italy, 1988-2011 - Poster - VTEC 2012.
- Schlesser, J. E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J. & Teo, A. Y. L. (2006). Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J Food Prot* 69, 990–998.
- Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 152, 687–695.
- Schüller, S., Frankel, G. & Phillips, A. D. (2004). Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* 6, 289–301.
- Schvartzman, M. S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F. & Jordan, K. (2011). Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1, S31–38.
- Scott, L., McGee, P., Sheridan, J. J., Earley, B. & Leonard, N. (2006). A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J Food Prot* 69, 6–11.
- Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P. E., Rørvik, L. M., Wasteson, Y. & Jørgensen, H. J. (2009). An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *Int J Food Microbiol* 133, 259–264.
- Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 18, 264–292.
- Sharma, M., Ryu, J.-H. & Beuchat, L. R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 99, 449–459.

- Sharp, J. C., Ritchie, L. D., Curnow, J. & Reid, T. M. (1994). High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J Infect* 29, 343–350.
- Shere, J. A., Bartlett, K. J. & Kaspar, C. W. (1998). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 64, 1390–1399.
- Siegler, R. L. (1995). The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 42, 1505–1529.
- Siegler, R. & Oakes, R. (2005). Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr* 17, 200–204.
- Silvestro, L., Caputo, M., Blancato, S., Decastelli, L., Fioravanti, A., Tozzoli, R., Morabito, S. & Caprioli, A. (2004). Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. *Epidemiol Infect* 132, 915–919.
- Slanetz, L. W. & Bartley, C. H. (1957). Numbers of *Enterococci* in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J Bacteriol* 74, 591–595.
- Smith, D. R., Moxley, R. A., Peterson, R. E., Klopfenstein, T. J., Erickson, G. E. & Clowser, S. L. (2008). A Two-Dose Regimen of a Vaccine Against *Escherichia coli* O157:H7 Type III Secreted Proteins Reduced Environmental Transmission of the Agent in a Large-Scale Commercial Beef Feedlot Clinical Trial. *Foodborne Pathogens and Disease* 5, 589–598.
- Smith, J. L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J Food Prot* 66, 1292–1303.
- Söderström, A., Lindberg, A. & Andersson, Y. (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill* 10, E050922.1.
- Solecki, O., MacRae, M., Strachan, N., Lindstedt, B.-A. & Ogden, I. (2009). *E. coli* O157 from sheep in northeast Scotland: prevalence, concentration shed, and molecular characterization by multilocus variable tandem repeat analysis. *Foodborne Pathog Dis* 6, 849–854.
- Son, I., Van Kessel, J. A. S. & Karns, J. S. (2009). Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog Dis* 6, 837–847.

- Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy, A. & Massa, S. (2003). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Lett Appl Microbiol* 36, 73–76.
- Spears, K. J., Roe, A. J. & Gally, D. L. (2006). A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 255, 187–202.
- Sperber, W. H. (1983). Influence of water activity on foodborne bacteria – a review. *Journal of Food Protection* 46, pp. 142–145.
- Stenutz, R., Weintraub, A. & Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30, 382–403.
- Stephan, R. & Untermann, F. (1999). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* 37, 1570–1572.
- Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J. & Beutin, L. (2008). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci* 91, 2561–2565.
- Stephan, R. & Kuhn, K. (1999). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine colic mastitis and their antibiotic resistance patterns. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 46, 423–427.
- Stevenson, J. & Hanson, S. (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun Dis Rep CDR Rev* 6, R116–118.
- Strachan, N. J., Fenlon, D. R. & Ogden, I. D. (2001). Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* 203, 69–73.
- Strachan, N. J. C., Dunn, G. M., Locking, M. E., Reid, T. M. S. & Ogden, I. D. (2006). *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* 112, 129–137.
- Su, C. & Brandt, L. J. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* 123, 698–714.
- Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., Yamauchi, A., Nakayama, O., Sakai, H. & other authors. (2005). An outbreak of Shigatoxin-

- producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Jpn J Infect Dis* 58, 398–400.
- Synge, B. A., Chase-Topping, M. E., Hopkins, G. F., McKendrick, I. J., Thomson-Carter, F., Gray, D., Rusbridge, S. M., Munro, F. I., Foster, G. & Gunn, G. J. (2003). Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiol Infect* 130, 301–312.
- Takada, A., Umitsuki, G., Nagai, K. & Wachi, M. (2007). RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 158–164.
- Tarr, P. I. (1995). *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20, 1–8; quiz 9–10.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A. & Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365, 1073–1086.
- Terzaghi, B. E. & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29, 807–813.
- Teunis, P., Takumi, K. & Shinagawa, K. (2004). Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Anal* 24, 401–407.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 2512–2518.
- Thomson, D. U., Loneragan, G. H., Thornton, A. B., Lechtenberg, K. F., Emery, D. A., Burkhardt, D. T. & Nagaraja, T. G. (2009). Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6, 871–877.
- Thornton, A. B., Thomson, D. U., Loneragan, G. H., Fox, J. T., Burkhardt, D. T., Emery, D. A. & Nagaraja, T. G. (2009). Effects of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccination on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle. *J Food Prot* 72, 866–869.
- Tilden, J., Jr, Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B. & other authors. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86, 1142–1145.

- Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O. & other authors. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 14941–14946.
- Turner, N., Sandine, W. E., Elliker, P. R. & Day, E. A. (1963). Use of Tetrazolium Dyes in an Agar Medium for Differentiation of *Streptococcus Lactis* and *Streptococcus Cremoris*. *Journal of Dairy Science* 46, 380–385.
- Uhlich, G. A., Rogers, D. P. & Mosier, D. A. (2010). *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis* 7, 935–943.
- Upton, P. & Coia, J. E. (1994). Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* 344, 1015.
- Usajewicz, I. & Nalepa, B. (2006). survival of *Escherichia coli* O157 in milk exposed to high temperatures and high pressure. *Food Technol Biotechnol* 44, 33–39.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J. & Klashinsky, S. (2001). Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J* 42, 714–720.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., Boutrand-Loeï, S., Meyrand, A. & Richard, Y. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS E. coli O157. *Lett Appl Microbiol* 25, 442–446.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Berardin, M., Bavai, C. & Beutin, L. (2005a). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett Appl Microbiol* 41, 235–241.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M. P., Bonin, V., Dernburg, A. & Richard, Y. (2005b). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int J Food Microbiol* 105, 83–88.
- Vernozy-Rozand, C. & Montet, M.-P. (2001). *Escherichia coli* O157:H7. Librairie Lavoisier, TEC & DOC. Paris, France.

- Verstraete, K., De Zutter, L., Messens, W., Herman, L., Heyndrickx, M. & De Reu, K. (2010). Effect of the enrichment time and immunomagnetic separation on the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive O157 from artificially inoculated cattle faeces. *Vet Microbiol* 145, 106–112.
- Vilte, D. A., Larzábal, M., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B. C., Elizondo, A. M., Cantet, R. J. C., Delgado, F., Meikle, V. & other authors. (2011). Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with γ -intimin C₂₈₀ and EspB proteins. *Vaccine* 29, 3962–3968.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C. & Delignette-Muller, M.-L. (2006). Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett Appl Microbiol* 42, 102–108.
- Vosough Ahmadi, B., Frankena, K., Turner, J., Velthuis, A. G. J., Hogeveen, H. & Huirne, R. B. M. (2007). Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *E. coli* O157:H7 in lactating cows in dairy herds. *Veterinary Research* 38, 755–771.
- Wachtel, M. R., Whitehand, L. C. & Mandrell, R. E. (2002). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot* 65, 18–25.
- Wagner, C. & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* 715, 17–34.
- Wang, G., Zhao, T. & Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 62, 2567–2570.
- Wang, G., Zhao, T. & Doyle, M. (1997). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *Journal of Food Protection Volume 60, Issue 6, 1997, Pages 610-613*.
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H. & Reeves, P. R. (2003). Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J Bacteriol* 185, 2936–2943.
- Wang, R., Bono, J. L., Kalchayanand, N., Shackelford, S. & Harhay, D. M. (2012). Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *J Food Prot* 75, 1418–1428.

- Waterman, S. R. & Small, P. L. C. (1998). Acid-Sensitive Enteric Pathogens Are Protected from Killing under Extremely Acidic Conditions of pH 2.5 when They Are Inoculated onto Certain Solid Food Sources. *Appl Environ Microbiol* 64, 3882–3886.
- Weaver, J. W., Kilpatrick, D. J. & Rowe, M. T. (1996). Evaluation of recovery protocols for heat-stressed enterovirulent *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 12, 257–263.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187, 1591–1603.
- Weinberg, Z. G., Ashbell, G., Chen, Y., Gamburg, M. & Sela, S. (2004). The effect of sewage irrigation on safety and hygiene of forage crops and silage. *Animal feed science and technology* 116, 271–280.
- Widiasih, D. A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S. & Shinagawa, K. (2004). Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 132, 67–75.
- Williams, A. P., Avery, L. M., Killham, K. & Jones, D. L. (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1075–1083.
- Wilson, J. B., McEwen, S. A., Clarke, R. C., Leslie, K. E., Wilson, R. A., Waltner-Toews, D. & Gyles, C. L. (1992). Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* 108, 423–439.
- Wong, A. R. C., Raymond, B., Collins, J. W., Crepin, V. F. & Frankel, G. (2012). The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). *Cell Microbiol* 14, 1051–1070.
- Wood, J. C., McKendrick, I. J. & Gettinby, G. (2007). A simulation model to assess herd-level intervention strategies against *E. coli* O157. *Epidemiol Infect* 135, 749–764.
- Yoon, J. W. & Hovde, C. J. (2008). All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Vet Sci* 9, 219–231.
- Yoshitomi, K. J., Jinneman, K. C. & Weagant, S. D. (2006). Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 20, 31–41.

- Yue, W.-F., Du, M. & Zhu, M.-J. (2012). High Temperature in Combination with UV Irradiation Enhances Horizontal Transfer of *stx2* Gene from *E. coli* O157:H7 to Non-Pathogenic *E. coli*. *PLoS ONE* 7, e31308.
- Zhao, B. & Houry, W. A. (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol* 88, 301–314.
- Zschöck, M., Hamann, H. P., Kloppert, B. & Wolter, W. (2000). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* 31, 203–208.
- Zweifel, C., Giezendanner, N., Corti, S., Krause, G., Beutin, L., Danuser, J. & Stephan, R. (2010). Characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. *J Food Prot* 73, 88–91.

Annexes

**Annexe 1 - Travaux sur la présence des STEC
et la prévalence des gènes *stx* dans le lait cru
(Farrokh *et al.*, 2012).**

Continents/Pays	Type d'échantillons	Prévalence des souches STEC (%) et/ou du gène <i>stx</i> . (N=Nombre d'échantillons)
Afrique		
Kenya	Lait cru de vache	0,8% (N=432) <i>E. coli</i> O157:H7. Une souche positive pour <i>stx1</i> ¹
	Lait cru de vache	0% (N=260) <i>E. coli</i> O157:H7 ²
Amerique		
Argentine	Lait cru de vache (cuve)	0% (N=150) <i>E. coli</i> O157:H7 ³
Brésil	Lait cru de vache (bétail atteint de mammite)	12,08 % (N=2144) échantillons positives pour la combinaison des gènes <i>hly</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> et/ou <i>eae</i> ⁴
USA	Lait cru de vache (cuve)	0,2 % (N=859) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁵
	Lait cru de vache (pour fromage)	0 % (N=67) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁶
	Lait cru de brebis (pour fromage)	0 % (N=22) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁶
	Lait cru de chèvre (pour fromage)	0,75 % (N=49) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁶
	Lait cru de vache (cuve)	2,4 % (N=248) STEC ⁷
	Lait cru de vache (cuve)	3,8 % (N=131) <i>E. coli</i> non-O157 possédant les gènes <i>stx2</i> ou <i>stx1</i> ⁸
	Lait cru de vache (cuve)	3,2 % (N=531) STEC ⁹
	Lait cru de vache (cuve)	0,75 % (N=268) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
	Lait cru de vache (cuve)	15,2 % (N=536) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ¹¹
	Filtres à lait	51 % (N=519) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ¹¹

Trinidad	Lait cru de vache (centre de collecte) Lait cru de vache (cuve)	0,8 % (N=380) <i>E. coli</i> O157 ¹² 0 % (N=933) STEC dans les cuves à lait ¹³
Asie		
Turquie	Lait cru de vache	1 % (N=100) <i>E. coli</i> O157 ¹⁴
Inde	Lait cru de vache et produits laitiers	1,8 % (N=553) <i>E. coli</i> O157 ¹⁵
Chine	Lait cru de vache	0 % (N=209) <i>E. coli</i> O157:H7 ¹⁶
Europe		
UE	Lait cru de vache	1,7 % (N~1300) en 2008 ¹⁷ 0,5 % (N=1079) en 2007 ¹⁷ 0,4% (N=3474) en 2006 ¹⁷ 1,4% (N=3947) en 2005 ¹⁷
Espagne	Lait cru de chèvre et de brebis (cuve)	10,8 % (N=360) STEC ¹⁸ 0,3 % (N=360) <i>E. coli</i> O157 ¹⁸
Ecosse	Lait cru de vache	0 % (N=500) STEC ¹⁹
Irlande du nord	Lait cru de vache (cuve)	2,14 % (N=420) STEC (possédant les gènes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> et/ou <i>eae</i>) ²⁰
Irlande	Lait cru (cuve) Filtres à lait	10% (N=20) <i>E. coli</i> O157 (negatif pour les gènes <i>stx</i>) ²¹ 3,1 % (N=161) <i>E. coli</i> O157 (positif pour les gènes <i>stx</i>) ²¹ 2,8 % (N=161) <i>E. coli</i> O26 (positif pour les gènes <i>stx</i>) ²¹

	Lait cru de vache Filtres à lait	36% (N=120) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ²² 0,8 % (N=120) d'échantillons positifs en <i>E. coli</i> O157, O111, O26, O103 et/ou O145 ²² 69% (N=117) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ²² 1,6 % (N=117) d'échantillons positifs pour <i>E. coli</i> O157, O111, O26, O103 et/ou O145 ²²
Pays-Bas	Lait cru de vache Filtres à lait Lait cru de vache (cuve)	0 % (N=140) <i>E. coli</i> O157 ²³ 0 % (N=4) <i>E. coli</i> O157 ²³ 0 % (N=13) <i>E. coli</i> O157 ²³
Italie	Lait cru de vache (revendeur) Lait cru de bufflone Lait cru de chèvre Lait cru de vache et chèvre Lait cru de vache	0,6 % (N=157) <i>E. coli</i> O26 (positifs en <i>stx1</i> et <i>stx2</i>) et non-O157 ²⁴ 0,6 % (N=160) <i>E. coli</i> O26 (positifs pour les gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>) ²⁵ 1,7 % (N=60) <i>E. coli</i> O157:H7 ²⁶ 0,14 % (N=144) <i>E. coli</i> O157 ²⁷ 0 % (N=994) STEC ²⁸
Grèce	Lait cru de vache Lait cru de chèvre Lait cru de brebis Lait cru de brebis Lait cru de chèvre Lait cru de brebis	2,2 % (N=950) <i>E. coli</i> O157 ²⁹ 0,7 % (N=460) <i>E. coli</i> O157 ²⁹ 0,8 % (N=595) <i>E. coli</i> O157 ²⁹ 1% (N=100) <i>E. coli</i> O157:H7 ³⁰ 12,6 % (N=87) <i>E. coli</i> O157:H7 ³⁰ 13,8 % (N=29) <i>E. coli</i> O157:H7 ³¹

Suisse	Lait cru de vache	0 % (N=310) STEC ³²
	Lait cru de chèvre (cuve)	16,3 % (N=344) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ³³
	Lait cru de brebis (cuve)	12,7 % (N=63) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ³³
France	Lait cru de vache	15 % (N=778) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ³⁴
		4,8 % (N=205) d'échantillons positifs pour <i>E. coli</i> O26, O103, O111, O145 or O157 ³⁵
		21 % (N=205) d'échantillons positifs pour les gènes <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> ³⁶
		3,4 % (N=205) d'échantillons positifs pour <i>E. coli</i> O91:H21 ³⁶
Allemagne	Lait cru de vache	0% (N=209) STEC ³⁷
	Lait cru de vache	2,5 % (N=403) STEC ³⁸
	Lait cru de vache	1,5 % (N=337) STEC autres qu' <i>E. coli</i> O157 ³⁹
Belgique	Lait cru de vache	0,7 % (N=143) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁴⁰
République Tchèque	Filtres à lait	2 % (N=192) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁴¹
Slovaquie	Lait cru de vache	0,4 % (N=269) <i>E. coli</i> O157 ⁴²

¹. S.M. Arimi, E. Koroti, E.K. Kang'ethe, A.O. Omoro, J.J. McDermott. 2005. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Tropica*, 96 (2005), pp. 1–8.

². E.K. Kangethe, J.O. Onono, B. McDermott, M. Arimi. 2007. Isolation of *E. coli* O157:H7 from milk and cattle faeces from urban dairy farming and non dairy farming neighbour households in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya: prevalence and risk factors. *East African Medical Journal*, 84 (2007), pp. S65–S75.

³. M.L. Roldán, I. Chinen, J.L. Otero, E.S. Miliwebsky, N. Alfaro, P. Burns, M. Rivas. 2007. Isolation, characterization and typing of *Escherichia coli* O157:H7 strains from beef products and milk. *Revista Argentina de Microbiologia*, 39 (2007), pp. 113–119.

⁴. W.M. Lira, C. Macedo, J.M. Marin. 2004. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (2004), pp. 831–866.

- ⁵. J.S. Karns, J.S. Van Kessel, B.J. McClusky, M.L. Perdue. 2007. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 90 (2007), pp. 3212–3219.
- ⁶. D.J. D'Amico, E. Groves, C.W. Donnelly. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection*, 71 (2008), pp. 1580–1589.
- ⁷. B.M. Jayarao, S.C. Donaldson, B.A. Straley, A.A. Sawant, N.V. Hegde, J.L. Brown. 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 89 (2006), pp. 2451–2458.
- ⁸. B.M. Jayarao, D.R. Henning. 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 84 (2001), pp. 2157–2162.
- ⁹. R.N. Cobbold, M.A. Davis, D.H. Rice, M. Szymanski, P.I. Tarr, T.E. Besser, D.D. Hancock. 2008. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *Journal of Food Protection*, 71 (2008), pp. 1023–1027.
- ¹⁰. S.E. Murinda, L.T. Nguyen, S.J. Ivey, B.E. Gillespie, R.A. Almeida, F.A. Draughon, 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. *Journal of Food Protection*, 65 (2002), pp. 752–759.
- ¹¹. J.A. Van Kessel, J.S. Karns, J.E. Lombard, C.A. Koprak. 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection*, 74 (2011), pp. 759–768.
- ¹². A.A. Adesiyun, S. Stoute, B. David. 2007. Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centers. *Food Control*, 18 (2007), pp. 312–320.
- ¹³. R.R. Roopnarine, D. Ammons, J. Rampersad, A.A. Adesiyun. 2007. Occurrence and characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) strains from dairy farms in Trinidad. *Zoonoses and Public Health*, 54 (2007), pp. 78–85.
- ¹⁴. O. Oksuz, M. Arici, S. Kurultay, T. Gumus. 2004. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, 15 (2004), pp. 453–456.
- ¹⁵. R. Sehgal, Y. Kumar, S. Kumar, 2008. Prevalence and geographical distribution of *Escherichia coli* O157 in India: a 10-year survey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102 (2008), pp. 380–38.
- ¹⁶. G. Chao, X. Zhou, X. Jiao, X. Qian, L. Xu. 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4 (2007), pp. 277–284.
- ¹⁷. EFSA (European Food Safety Authority), 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 8 (2010), p. 1496.
- ¹⁸. J. Rey, S. Sanche, J.E. Blanco, J.H. De Mendoza, M.H. De Mendoza, A. Garcia, C. Gil, N. Tejero, R. Rubio, J.M. Alonso. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (2006), pp. 212–217.
- ¹⁹. J.E. Coia, Y. Johnston, N.J. Steers, M.F. Hanson. 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk acid raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology*, 66 (2001), pp. 63–69.
- ²⁰. R. McKee, R.H. Madden, A. Gilmour. 2003. The occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments. *Journal of Food Protection*, 66 (2003), pp. 1576–1580.
- ²¹. M. Murphy, J.F. Buckley, P. Whyte, M.O. Mahony, W. Anderson, P.G. Wall, S. Fanning. 2007. Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *Zoonoses and Public Health*, 54 (2007), pp. 358–365.
- ²². M.J. Lynch, L. O'Connor, E.M. Fox, K. Jordan, M. Murphy. 2012. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O111, O26, O103, O145 in Irish dairy cattle and raw milk: prevalence and epidemiology of emergent strains. *Zoonoses and Public Health*, 59 (2012), pp. 264–271.

- ²³. J.M. Schouten, E.A.M. Graat, K. Frankena, A.W. van de Giessen, W.K. van der Zwaluw, M.C.M. de Jong. 2005. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. *Veterinary Microbiology*, 107 (2005), pp. 193–204.
- ²⁴. M. Pontello, C. Bersani, S. Colmegna, C. Cantoni, C. Mamma, M. Rizzi, A. Barri, L. Nozza. 2003. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in foodstuffs of animal origin. *European Journal of Epidemiology*, 18 (2003), pp. 157–160.
- ²⁵. V. Lorusso, A. Dambrosio, N.C. Quaglia, A. Parisi, G. La Salandra, G. Lucifora, G. Mula, S. Virgilio, L. Carosielli, A. Rella, M. Dario, G. Normanno. 2009. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26 in raw water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk products in Italy. *Journal of Food Protection*, 72 (2009), pp. 1705–1708.
- ²⁶. R. Foschino, A. Invernizzi, A. Barucco, K. Stradiotto. 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *The Journal of Dairy Research*, 69 (2002), pp. 213–225.
- ²⁷. C. Picozzi, R. Foschino, A. Heuvelink, R. Beumer. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Letters in Applied Microbiology*, 40 (2005), pp. 491–496.
- ²⁸. EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: taking stock. *The EFSA Journal*, 9 (2011), p. 2390.
- ²⁹. N. Solomakos, A. Govaris, A.S. Angelidis, S. Pournaras, A. Rodi Burriel, S.K. Kritas, D.K. Papageorgiou. 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiology*, 26 (2009), pp. 865–871.
- ³⁰. C. Dontorou, C. Papadopoulou, G. Filioussis, V. Economou, I. Apostolou, G. Zakkas, A. Salamoura, A. Kansouzidou, S. Levidiotou. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2003), pp. 273–279.
- ³¹. A. Zdragas, G. Samouris, G. Filioussis, E. Petridou, V. Giantzi. 2009. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's and goat's milk in Greece. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 60 (2009), pp. 36–38.
- ³². R. Stephan, K. Buehler. 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bulk-tank milk samples from north-east Switzerland. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 52 (2001), pp. 122–123.
- ³³. J.E. Muehlherr, C. Zweifel, S. Corti, J.E. Blanco, R. Stephan. 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*, 86 (2003), pp. 3849–3856.
- ³⁴. S. Raynaud, P. Boscher, P. Picant, B. Mathieu, C. Degand, B. Poutreil, V. Heuchel, Y.M. Chaltelain, C. Vernozy-Rozand. 2006. Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. *Bulletin Epidémiologique*, 21 (2006), pp. 1–3.
- ³⁵. S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, P. Fach. 2007. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (2007), pp. 284–288.
- ³⁶. J. Madic, C. Lecureuil, F. Dilasser, S. Derzelle, E. Jamet, P. Fach, F. Auvray. 2009. Screening of food raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (2009), pp. 447–451.
- ³⁷. U. Messelhäusser, H. Beck, P. Gallien, B. Schalch, U. Busch. 2003. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. in cattle, food and water sources on Alpine pastures in Bavaria. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59 (2008), pp. 103–106.
- ³⁸. C. Zweifel, M. Rusch, S. Corti, R. Stephan. 2006. Determination of various microbiological parameters in raw milk and raw milk cheese produced by bio-farms. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 57 (2006), pp. 13–16.
- ³⁹. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*, 3 (2090) (2011), pp. 1–378.
- ⁴⁰. K. De Reu, K. Grijspeerdt, L. Herman. 2004. A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, 24 (2004), pp. 17–36.

⁴¹. A. Čížek, M. Dolejská, R. Novotná, D. Haas, M. Vyskočil. 2008. Survey of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2008), pp. 852–860.

⁴². EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: taking stock. *The EFSA Journal*, 9 (2011), p. 2390.

**Annexe 2 - Travaux sur la présence des STEC
et la prévalence des gènes *stx* dans les
fromages et autres produits laitiers
différents du lait (Farrokh *et al.*, 2012).**

Continents / Pays	Type d'échantillons	Prévalence des STEC et/ou prevalence du gène <i>stx</i> (N=nombre d'échantillons)
Amerique		
Pérou	Fromage type pâte molle au lait cru	7,8 % (N=102) <i>E. coli</i> O157 ¹
Vénézuela	Fromage de type Telita	2 % (N=100) <i>E. coli</i> O157 ²
Asie		
Turquie	Fromage local à base de lait cru	4% (N=50) <i>E. coli</i> O157 ³
Europe		
UE	Fromage au lait cru	0,2 % (N=2876) STEC en 2005 ⁴ 2,4 % (N=1064) STEC en 2006 ⁴ 0,5 % (N=1961) STEC en 2007 ⁴ 1,8 % (N~700) STEC en 2008 ⁴
Belgique	Fromage à base de lait cru de vache Fromage à base de lait cru de chèvre et de brebis Beurre et crème à base de lait cru Beurre, yaourt, fromage, crème glacée, fromage frais à base de lait cru	5,6 % (N=71) <i>E. coli</i> O157:H7 ⁵ 0% (N=222) <i>E. coli</i> O157 ⁶ 0% (N=181) <i>E. coli</i> O157 ⁶ 0% (N=64, N=9, N=16, N=7, N=4 resp.) ⁷
Italie	Fromage à base de lait cru Fromage à base de lait pasteurisé Mozzarella à base de lait cru de bufflonne	0 % (N=143) <i>E. coli</i> O157 ⁸ 0 % (N=60) <i>E. coli</i> O157 ⁸ 0 % (N=93) <i>E. coli</i> O157 ⁹

	Produits laitiers à base de lait de vache pasteurisé	0 % (N= 657) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
	Produits laitiers à base de lait cru de vache	0 % (N=811) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
	Produits laitiers à base de lait de brebis pasteurisé	0 % (N=477) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
	Produits laitiers à base de lait cru de brebis	0 % (N=502) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
	Mozzarella à base de lait de bufflonne	0 % (N=501) <i>E. coli</i> O157 ¹⁰
Portugal	Fromage à base de lait cru de vache, brebis et de chèvre	0 % (N=70) <i>E. coli</i> O157 ¹¹
Espagne	Produits laitiers à base de lait cru d'ovins et de caprins (lait, caillé et fromage)	1,8 % (N=502) STEC (45 échantillons <i>stx</i> positifs) ¹²
	Fromage frais (ovin/caprin)	0 % (N=103) STEC (4 échantillons <i>stx</i> positifs) ¹²
	Fromage	0 % (N=39) STEC (2 échantillons <i>stx</i> positifs) ¹²
	Fromage au lait cru de brebis (affinage long)	2,4 % (N=84) STEC ¹³
Ecosse	Fromage au lait cru de vache	0 % (N=739) <i>E. coli</i> O157 ¹⁴
Suisse	Fromage au lait cru de vache et de chèvre	2 % (N=796) STEC ¹⁵
	Fromage au lait cru de vache, de brebis et de chèvre	1,9 % (N=1502) STEC ¹⁶
France	Fromage au lait cru	11,7 % (N=180) STEC ¹⁷
	Fromage au lait cru	13,1 % (N=1039) STEC ¹⁸
	Fromage	1 % (N=603) STEC (10 % échantillons <i>stx</i> positif) ¹⁹
	Fromage au lait cru	27,7 % (N=112) échantillons <i>stx</i> positif ²⁰

	Fromage	6,5% (N=400) présence concomitante des gènes <i>stx</i> , <i>eae</i> et de marqueurs associés aux 5 principaux sérotypes de STEC ²¹
Allemagne	Fromage au lait cru de vache	0,48% (N=209) STEC ²²

¹. A. Mora, S.L. Leon, M. Blanco, J.E. Blanco, C. Lopez, G. Dahbi, A. Echeita, E.A. Gonzalez, J. Blanco. 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *International Journal of Food Microbiology*, 114 (2007), pp. 204–210.

². J.G. Márquez, C.E.R. García. 2007. Pathogenic microflora found in white “telita” cheese made in four states of Venezuela. *Anales Venezolanos de Nutricion*, 20 (2007), pp. 17–21.

³. O. Oksuz, M. Arici, S. Kurultay, T. Gumus. 2004. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, 15 (2004), pp. 453–456.

⁴. EFSA (European Food Safety Authority). 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 8 (2010), p. 1496.

⁵. K. De Reu, W. Debeuckelaere, N. Botteldoorn, J. De Block, L. Herman. 2002. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety*, 22 (2002), pp. 183–196.

⁶. H. Imberechts, D. Pierard, L. Vanholme, K. Vereecken. 2007. Report on Zoonotic Agents in Belgium in 2007 (2007), pp. 41–44 (http://www.favv.be/publications-en/documents/2006_Report-on-zoonotic-agents_en.pdf). Last accessed January 3rd 2012).

⁷. K. De Reu, K. Grijspeerdt, L. Herman. 2004. A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, 24 (2004), pp. 17–36.

⁸. T. Civera, L. Decastelli, M. Martorana, A. Dalmasso, D. Nucera, M.T. Bottero. 2007. Survey on the presence of enterovirulent *Escherichia coli*, including *E. coli* O157, in cheese manufactured in the Italian Alpine Region. *International Journal of Food Science*, 19 (2007), pp. 229–238.

⁹. A. Martucciello, S. Astarita, A. Ruggia, D. Alfano, C. Morena, G. Galiero. 2008. A survey on *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* O157 presence in Campania buffalo mozzarella cheese by real-time PCR. *Industrie Alimentari*, 47 (2008), pp. 1–2.

¹⁰. G. Conedera, P. Dalvit, M. Martini, G. Galiero, M. Gramaglia, E. Goffredo, G. Loffredo, S. Morabito, D. Ottaviani, F. Paterlini, G. Pezzotti, M. Pisanu, P. Semprini, A. Caprioli. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (2004), pp. 67–73.

¹¹. G. Almeida, A. Figueiro, M. Rola, R.M. Barros, P. Gibbs, T. Hogg, P. Teixeira. 2007. Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. *Journal of Food Protection*, 70 (2007), pp. 1710–1716.

¹². J. Rey, S. Sanche, J.E. Blanco, J.H. De Mendoza, M.H. De Mendoza, A. Garcia, C. Gil, N. Tejero, R. Rubio, J.M. Alonso. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (2006), pp. 212–217.

¹³. I. Caro, M.R. Garcia-Armesto. 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 116 (2007), pp. 410–413.

¹⁴. J.E. Coia, Y. Johnston, N.J. Steers, M.F. Hanson. 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk acid raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology*, 66 (2001), pp. 63–69.

- ¹⁵. R. Stephan, S. Schumacher, S. Corti, G. Krause, J. Danuser, L. Beutin. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, 91 (2008), pp. 2561–2565.
- ¹⁶. C. Zweifel, N. Giezendanner, S. Corti, G. Krause, L. Beutin, J. Danuser, R. Stephan. 2010. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. *Journal of Food Protection*, 73 (2010), pp. 88–91.
- ¹⁷. P. Fach, S. Perelle, F. Dilasser, 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. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (2001), pp. 809–818.
- ¹⁸. C. Vernozy-Rozand, C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai, M.P. Montet, V. Bonin, A. Dernburg, Y. Richard. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 105 (2005), pp. 83–88.
- ¹⁹. N. Pradel, V. Livrelli, C. De Champs, J.B. Palcoux, A. Reynaud, F. Scheutz, J. Sirot, B. Joly, 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2000), pp. 1023–1031.
- ²⁰. F. Auvray, C. Lecureuil, F. Dilasser, J. Tache, S. Derzelle. 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (2009), pp. 554–559.
- ²¹. J. Madic, N. Vingadassalon, C.P. de Garam, M. Marault, F. Scheutz, H. Brugere, E. Jamet, F. Auvray. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (2011), pp. 2035–2041.
- ²². U. Messelhäusser, H. Beck, P. Gallien, B. Schalch, U. Busch. 2008. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. in cattle, food and water sources on Alpine pastures in Bavaria. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59 (2008), pp. 103–106.

**Annexe 3 - Epidémies provoquées par les
STEC impliquant le lait et les produits laitiers
(Farrokh *et al.*, 2012).**

Date	Type de produit laitier	Sérotype, facteurs de virulence	Nombre de cas	Pays
1986	Lait cru	O157:H7	2 SHU	USA ¹
1989	Lait cru	O22:H8	1 SHU	Allemagne ²
1990	Lait cru	O157:H7	2 SHU	USA (Washington) ³
1991	Yaourt au lait pasteurisé	O157:H7	16 - 5 SHU	UK (Angleterre et Pays de Galles) ⁴
1992-1993	Fromages à base de lait cru de vache et de chèvre	O119, <i>stx2</i>	4 SHU	France (Cher) ^{5,6}
1992-1993	Lait cru	O157:H7	14 - 0 SHU	USA (Oregon) ⁷
1993	Lait	O157	7 - 3 SHU	UK (Angleterre et Pays de Galles) ^{8,9}
1994	Lait pasteurisé	O157:H7, <i>stx2</i>	>100 - 9 SHU	UK (Ecosse) ¹⁰
1994	Fromage au lait cru	O157, <i>stx2</i>	22 - 1 SHU	UK (Ecosse) ^{11,12}
1994	Lait	O157, <i>stx2</i>	8 - 3 SHU	UK (Ecosse) ¹¹

1994	Fromage au lait cru de chèvre	O103	4 SHU	France (Ardèche) ¹³
1994	Lait (contamination post-pasteurisation suspectée)	O104:H21	11 confirmés, 7 suspectés	USA (Montana) ¹⁴
1995	Fromage à base de lait cru de chèvre	O157:H7	4 SHU	République Tchèque ¹⁵
1996	Fromage au lait cru	O110:H-	3 – 0 SHU	Allemagne ¹⁶
1996	Lait	O157	12 - 1 SHU	UK ¹⁷
1997-01	Lait non pasteurisé	O157	6	Finlande ¹⁸
1997-09	Lait non pasteurisé	O157	3 SHU	Finlande ¹⁸
1997-10	Lait non pasteurisé	O157	2 SHU	Finlande ¹⁸
1997-10	Fromage	O157	5 (2 confirmés)	UK ¹⁹
1998	Lait non pasteurisé	O157	17	Finlande ¹⁸
1998	Fromage à base de lait non pasteurisé	O157	4	UK (Ecosse) ²⁰
1998	Fromage au lait cru	O157 stx2	10 - 1 SHU	UK ²¹
1998	Crème non pasteurisée	O157:H7	7	UK (Angleterre) ²²
1998-06	Fromage	O157:H7	55 - 2 SHU	USA (Wisconsin) ²³
1999	Lait de ferme	O157	38 - 3 SHU	UK ²⁴

1999	Fromage à base de lait cru de chèvre (fait maison)	O157	27 - 1 SHU	UK (Ecosse) ²⁵
1999	Lait cru	O157	3	UK (Ecosse) ²⁰
2000	Lait cru	O157	2	UK (Ecosse) ²⁰
2001	Lait cru de chèvre	O157:H-, sorbitol+, <i>stx2+</i> , <i>stx2c+</i>	2 - 1 SHU	Autriche ²⁶
2001-08	Lait de chèvre	O157:H7	5 - 2 SHU	Canada (Colombie Britannique) ²⁷
2002 – 2003	Gouda au lait cru	O157:H7	13 - 2 SHU	Canada (Alberta) ²⁸
2003	Lait cru de vache	O26:H-, <i>stx2+</i> , <i>eae+ hly+</i>	2 SHU	Autriche ²⁹
2003-11	Lait cru de vache	O157, <i>stx2+</i> , <i>eae+ ehxA+</i>	9 - 4 SHU (même famille)	Slovaquie ³⁰
2003-2004	Lait	O157:H ⁻	25	Danemark ³¹
2004-07	Fromage au lait cru	O157:H7	3	Canada (Quebec) ³²
2004-2006	Fromage de chèvre à base de lait cru	O157, <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>	2 SHU	France ^{33, 34}
2005-04	Lait	O157:H7	6	Canada (Ontario) ²⁸
2005-05	Milk shake	O157:H7	16 - 1 SHU	Canada (Alberta) ³⁵

2005-12	Lait cru	O157:H7	18 - 4 SHU	USA (Washington - Oregon) ³⁶
2005-12	Fromage de vache à base de lait cru	O26, <i>stx+</i>	6 SHU	France (Normandie) ³⁷
2006	Lait cru	O80:H-, <i>stx1+</i> , <i>eae+ hly+</i> , O145, <i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>	59 - 1 SHU	Allemagne ³⁸
2006	Fromage à base de lait cru de vache	O157:H7	2 SHU	USA (Californie) ³⁹
2006-09	Lait cru et colostrum de vache	O157:H7 et autres sérotypes de STEC	6 - 2 SHU	USA (Californie) ⁴⁰
2007	Glace	O145:H28, <i>stx2+</i> , <i>eae+</i> , <i>ehxA+</i> O26:H11, <i>stx1+</i> , <i>eae+ ehxA+</i>	12 - 5 SHU	Belgique ^{41, 42}
2008	Lait cru de vache	O157 :NM	7 - 3 SHU et 1 PTT	USA (Connecticut) ⁴³
2008-05	Lait cru de chèvre	O157:H7	4 - 1 SHU	USA (Missouri) ⁴⁴
2009-11	Lait cru	<i>E. coli</i>	3	USA (Washington) ⁴⁵
2010-05	Lait cru	O157:H7	8 - 1 SHU	USA (Minnesota) ⁴⁶
2010-06	Lait cru de chèvre	O157:H7 Campylobacter	30 – 2 SHU	USA (Colorado) ⁴⁷
2010-10	Gouda	O157:H7	38 -1 SHU	USA (5 états) ⁴⁸

2010-12	Fromage à base de lait cru	O157:H7	8	USA (4 états) ⁴⁹
---------	----------------------------	---------	---	-----------------------------

- ¹. M.L. Martin, L.D. Shipman, J.G. Wells, M.E. Potter, K. Hedberg, I.K. Wachsmuth, R.V. Tauxe, J.P. Davis, J. Arnoldi, J. Tilleli. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 328 (1986), p. 1043.
- ². J. Bockemühl, H. Karch, H. Rüssmann, S. Aleksic, R. Wiss, P. Emrich. 1990. Shiga-like toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8: Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom. *Bundesgesundheitsblatt*, 33 (1990), pp. 3–6.
- ³. J.G. Wells, L.D. Shipman, K.D. Greene, E.G. Sowers, J.H. Greene, D.N. Camron, F.P. Downes, M.L. Martin, P.M. Griffin, S.M. Ostroff. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (1991), pp. 985–989.
- ⁴. D. Morgan, C.P. Newman, D.N. Hutchinson, A.M. Waiker, B. Rowe, F. Majid. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*, 111 (1993), pp. 181–187.
- ⁵. C. Casenave, J.C. Desenclos, E. Maillot, S. Benoît, G. Deschenes, H. Nivet, F. Grimont, S. Baron, P. Mariani, P.A.D. Grimont. 1993. Écllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 48 (1993), pp. 222–224.
- ⁶. G. Deschênes, C. Casenave, F. Grimont, J.C. Desenclos, S. Benoit, M. Collin, S. Baron, P. Mariani, P.A. Grimont, H. Nivet. 1996. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatric Nephrology*, 10 (1996), pp. 203–205 .
- ⁷. W.E. Keene, K. Hedberg, D.E. Herriott, D.D. Hancock, R.W. McKay, T.J. Barrett, D.W. Fleming. 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *Journal of Infectious Diseases*, 176 (1997), pp. 815–818.
- ⁸. A. Ammon. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance*, 2 (1997), pp. 91–95 (article 133, 1997-12-01).
- ⁹. P.G. Wall, R.J. McDonnell, G.K. Adak, T. Cheasty, H.S. Smith, B. Rowe. 1996. General outbreaks of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Communicable Diseases Report, CDR Reviews*, 6 (1996), pp. R26–R33.
- ¹⁰. P. Upton, J.E. Coia. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet*, 344 (1994), p. 1015.
- ¹¹. A. Ammon. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance*, 2 (1997), pp. 91–95 (article 133, 1997-12-01).
- ¹². N.J.C. Strachan, G.M. Dunn, E. Mary, M.E. Locking, T.M.S. Reid, I.D. Ogden. 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, 112 (2006), pp. 129–137.
- ¹³. B. Decludt. 1995. Cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques dans le département de l'Ardèche en 1994. *Institut de Veille Sanitaire, France* (1995).
- ¹⁴. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 1995. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 — Helena, Montana, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44 (1995), pp. 501–503.
- ¹⁵. M. Bielaszewska, J. Janda, K. Bláhová, H. Mínaríková, E. Jíková, M.A. Karmali, J. Laubová, J. Šíkulová, M.A. Preston, R. Khakhria, H. Karch, H. Klazarová, O. Nyc. 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiology and Infection*, 119 (1997), pp. 299–305.
- ¹⁶. J. Bockemühl, H. Karch. 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen. *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994–1995). *Bundesgesundheitsblatt*, 39 (1996), pp. 290–296.
- ¹⁷. A. Clark, S. Morton, P. Wright, J. Corkish, F.J. Bolton, J. Russell. 1997. A community outbreak of vero-cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection linked to a small farm dairy. *Communicable Disease Report. CDR Review*, 7 (1997), pp. R206–R211.

- ¹⁸. E. Lahti, M. Eklund, P. Ruuru, A. Siitonen, L. Rantala, P. Nuorti, T. Honkanen-Busalski. 2002. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 (2002), pp. 189–195.
- ¹⁹. N.J.C. Strachan, M.P. Doyle, F. Kasuga, O. Rotariu, I.D. Ogden. 2005. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (2005), pp. 35–47.
- ²⁰. N.J.C. Strachan, G.M. Dunn, E. Mary, M.E. Locking, T.M.S. Reid, I.D. Ogden. 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, 112 (2006), pp. 129–137.
- ²¹. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). 1998. Outbreak of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection in Dorset. *CDR Weekly: Communicable Disease Report*, 8 (183) (1998), p. 186.
- ²². CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). 1998. Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurised cream in England. *Eurosurveillance*, 2 (1998), p. 1135 (1998-10-29).
- ²³. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds—Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49 (2000), pp. 911–913.
- ²⁴. Anonymous. 1999. Outbreak of vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 infection in North Cumbria. *CDR Weekly*, 9 (1999), pp. 95–98 (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/1999/cdr1199.pdf>. Last accessed 17th October 2011).
- ²⁵. J. Curnow. 1999. *Escherichia coli* O157 outbreak in Scotland linked to unpasteurised goat's milk. *Eurosurveillance*, 3 (1999) (article 1387).
- ²⁶. F. Allerberger, M. Wagner, P. Schweiger, H.P. Rammer, A. Resch, M.P. Dierich, A.W. Friedrich, H. Karch. 2001. Infections à *Escherichia coli* O157 associées au lait non pasteurisé. *Eurosurveillance*, 6 (2001) (article 379, 2001-10-01).
- ²⁷. L. McIntyre, J. Fung, A. Paccagnella, J. Isacc-Renton, F. Rockwell, B. Emerson, T. Preston. 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canadian Communicable Disease Report*, 28 (2002), pp. 6–8.
- ²⁸. L. Honish, G. Predy, N. Hislop, L. Chui, K. Kowalewska-Grochowska, L. Trottier, C. Kreplin, I. Zazulak. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Revue canadienne de Santé publique*, 96 (2005), pp. 182–184.
- ²⁹. F. Allerberger, A.W. Friedrich, K. Grif, M.P. Dierich, H.J. Dornbusch, C.J. Mache, E. Nachbaur, M. Freilinger, P. Rieck, M. Wagner. 2003. Hemolytic–uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *International Journal of Infectious Diseases*, 7 (2003), pp. 42–45.
- ³⁰. A. Liptakova, L. Siegfried, J. Rosocha, L. Podracka, E. Bogyiova, D. Kotulova. 2004. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (2004), pp. 576–578.
- ³¹. C. Jensen, S. Ethelberg, A. Gervelmeyer, E.M. Nielsen, K.E. Olsen, K. Mølbak. 2006. First general outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Eurosurveillance*, 11 (2006) (article 597, 2006-02-01).
- ³². MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec), 2004. Mise en garde - Onze personnes malades à la suite de la consommation de fromages au lait cru fabriqués à la ferme. Press Release, 2004-07-14.
- ³³. INVS (Institut de Veille Sanitaire). 2004. Investigation autour de deux cas de SHU à *E. coli* O157 dans les Vosges. (June 2004).
- ³⁴. E. Espié, V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. De Valk, C. Vernozy-Rozand. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134 (2006), pp. 143–146.
- ³⁵. A.L. Becker. 2005. Alberta *E. coli* outbreak tied to milk shakes. Press release CIDRAP. 2005-05-13.
- ³⁶. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2007. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk — Washington and Oregon, November–December 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56 (2007), pp. 165–167.

- ³⁷. INVS (Institut de Veille Sanitaire). 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, nord-ouest de la France, octobre-décembre 2005 (2007). Available at http://www.invs.sante.fr/publications/2008/epidemie_e_coli_camembert/rapport_epidemie_stec.pdf. Last accessed 21st August 2012.
- ³⁸. RKI (Robert Koch Institut). 2008. Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epidemiologisches Bulletin*, 11 (2008), pp. 16–18.
- ³⁹. D. Buglino, K. Smith-Sayer, S. Fortino, J. Van Meter, E. Frykman, L. Crawford-Mikszta, C. Myers, S. Himathongkham, M. Palumbo, J. Atwell, T. Chang, D. Csuti, S. Fontanoz, Y. Gerbremichael, J. Glover, J. O'Connell, B. Sun, C. Wheeler, Y. Zhao, M. Lynch. 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows — California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57 (2008), pp. 625–628.
- ⁴⁰. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows — California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57 (2008), pp. 625–628.
- ⁴¹. K. De Schrijver, G. Buvens, B. Possé, D. Van den Branden, C. Oosterlynck, L. De Zutter, K. Eilers, D. Piérard, K. Dierick, R. Van Damme-Lombaerts, C. Lauwers, R. Jakobs. 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance*, 13 (2008) (article 8041, 2008-02-14).
- ⁴². G. Buvens, B. Possé, K. De Schrijver, L. De Zutter, S. Lauwers, D. Pierard. 2011. Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related haemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (2011), pp. 421–426.
- ⁴³. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2007. Foodborne Outbreak Online Database, 2007 July, Colorado, *E. coli* Shiga Toxin Producing O121, O26, O84, Prison Jail. American Cheese Pasteurized (2007) (<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Last accessed December 24th 2011).
- ⁴⁴. B. Marler. 2009. 2008 Raw Goat Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Linked to Dairy and Retail. Marlor Blog (2009) (2009-12-16, <http://www.marlerblog.com/legal-cases/2008-raw-goat-milk-e-coli-o157h7-outbreak-linked-to-dairy-and-retail/>. Last accessed 23 April 2012).
- ⁴⁵. Food Poison Journal, 2009-12-02, presented by Marler Clark. <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/raw-milk-e-coli-strikes-again-recent-illnesses-are-reminder-of-risks-from-drinking-raw-milk/>. Last accessed 19th April 2012.
- ⁴⁶. Minnesota Department of Health, 2010. Three more *E. coli* cases linked to raw milk from farm. News release, 2010-06-11, <http://www.health.state.mn.us/news/pressrel/2010/ecoli061110.html>. Last accessed 23rd April 2012.
- ⁴⁷. B. Marler. 2010. Raw Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Strikes Minnesota. Seventh Outbreak in 2010. Marler Blog (2010) (2010-05-28, <http://www.marlerblog.com/legal-cases/raw-milk-e-coli-o157h7-outbreak-strikes-minnesota-seventh-outbreak-in-2010/>. Last accessed 23 April 2012).
- ⁴⁸. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. (2010) (2010-11-24).
- ⁴⁹. M. Rothschild. 2010. Sally Jackson cheese confirmed as outbreak source. Food Safety News-12-21, http://beforeitsnews.com/story/319/970/Sally_Jackson_Cheese_Confirmed_as_Outbreak_Source.html. Last accessed 17th October 2011.

Annexe 4 – Publication 1.

Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production.

Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Mischczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Cerf O.

International Journal of Food Microbiology. 2012. *In press.*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Review

Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production

Choreh Farrokh ^{a,*}, Kieran Jordan ^{b,*}, Frederic Auvray ^c, Kathleen Glass ^d, Hanne Oppegaard ^e, Sabrina Raynaud ^f, Delphine Thevenot ^g, Robin Condron ^h, Koen De Reu ⁱ, Alexander Govaris ^j, Klaus Heggum ^k, Marc Heyndrickx ^{i,1}, Joerg Hummerjohann ^m, Denise Lindsay ⁿ, Stephane Miszczycha ^g, Sylvie Moussiégt ^a, Karen Verstraete ⁱ, Olivier Cerf ^o

^a CNIEL – French Dairy Inter-branch Organisation, 42 rue de Chateaudun, FR-75009 Paris, France

^b Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy Cork, Ireland

^c Anses, Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, 23 avenue du Général de Gaulle, FR-94706 Maisons-Alfort, France

^d Food Research Institute, University of Wisconsin, 1550 Linden Drive, Madison, WI-53706, USA

^e Tine SA, Bedriftsveien, NO-0902, Oslo, Norway

^f Institut de l'Élevage, Agropole, 23 rue Jean Baldassini, FR-69364 Lyon cedex 07, France

^g VetAgro-Sup 1, avenue Bourgelat, FR-69280 Marcy l'Étoile, France

^h Dairy Australia, Locked Bag, 104 Rinders Lane, AU-8009 Victoria, Australia

ⁱ Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO), Technology & Food Science Unit, Brusselsesteenweg 370, BE-9090 Melle, Belgium

^j University of Thessaly, Veterinary Faculty, 224 Trikalon Street, GR-43100 Karditsa, Greece

^k Danish Dairy Board, Frederiks Allé 22, DK-8000 Aarhus C, Denmark

^l Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

^m Agroscope Liebefeld - Posieux ALP, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern, Switzerland

ⁿ Fonterra Research Centre, Private Bag 11029, Palmerston North 4442, New Zealand

^o Université Paris-Est, Alfort Veterinary School, 7 avenue du Général de Gaulle, FR-94700 Maisons-Alfort, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2012

Received in revised form 31 July 2012

Accepted 1 August 2012

Available online xxx

Keywords:

STEC

VTEC

Milk

Dairy products

ABSTRACT

The involvement of the pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC; also called verocytotoxic-producing *E. coli* or VTEC) in sporadic cases and disease outbreaks is presently increasing. Infrequent cases are due to ingestion of milk and dairy products. As ruminants are healthy carriers of STEC and most dairy products may provide these bacteria with favourable conditions for their growth, milk and dairy products are a potential source of STEC. But not all STEC serotypes are pathogens; only relatively small numbers in the entire family of STEC are pathogenic. This review focuses on the recent advances in understanding of STEC and their significance in milk and dairy products. It is intended to gather the information that is needed to understand how these bacteria are described, detected and characterised, how they contaminate milk and grow in dairy products, and how the dairy industry can prevent them from affecting the consumer.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
1.1. Background	0
1.2. Purpose of this review	0
2. Bacteriological characteristics	0
2.1. Shiga-toxin-producing <i>E. coli</i>	0
2.2. Growth and inactivation	0
2.3. Resistance to environmental stress	0
3. Detection and isolation methods	0
3.1. Culture and isolation methods	0
3.1.1. Enrichment	0
3.1.2. Immunomagnetic separation	0

* Corresponding authors.

E-mail addresses: cfarrokh@cniel.com (C. Farrokh), K.Jordan@teagasc.ie (K. Jordan).¹ These authors contributed equally to this work.

0168-1605/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>

Please cite this article as: Farrokh, C., et al., Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production, International Journal of Food Microbiology (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>

3.1.3.	Selective media	0
3.1.4.	Colony hybridisation and immunoblot assays	0
3.1.5.	Confirmation of suspected colonies	0
3.2.	Methods for the detection of STEC in food	0
3.2.1.	Culture-based methods	0
3.2.2.	Molecular-based and immunological methods	0
3.3.	Genetic typing of STEC isolates	0
4.	Diversity of serotypes, virulence factors and the concept of seropathotypes	0
4.1.	Diversity of serotypes and seropathotypes	0
4.2.	Virulence factors	0
5.	STEC sources and routes to raw milk on the farm	0
5.1.	STEC excretion by dairy ruminants	0
5.1.1.	Faecal excretion	0
5.1.2.	Intra-mammary excretion	0
5.2.	Sources and circulation of strains on the farm	0
5.2.1.	Acquisition of STEC by cattle and small ruminants on the farm	0
5.2.2.	Circulation of strains on and between farms	0
5.2.3.	Milk contamination	0
6.	Occurrence of STEC in raw milk and raw milk cheeses	0
6.1.	Occurrence of STEC in raw milk	0
6.2.	Occurrence of STEC in cheeses and other dairy products	0
7.	STEC human infection and the main outbreaks associated with milk and dairy products	0
7.1.	STEC in humans	0
7.2.	Different vehicles of human infection	0
7.3.	Foodborne STEC infections and outbreaks	0
8.	Survival of STEC during cheesemaking	0
8.1.	Factors affecting growth and survival of STEC during cheesemaking	0
8.1.1.	pH	0
8.1.2.	Temperature	0
8.1.3.	Water activity (a_w) and salting	0
8.1.4.	Anti-microbial interactions	0
8.2.	Behaviour of STEC during cheesemaking	0
8.2.1.	Survival/growth during cheese manufacture	0
8.2.2.	Survival during cheese ripening and storage	0
8.2.3.	New technologies for the control of STEC in cheese	0
9.	Measures for preventing contamination of milk and milk products	0
9.1.	Interventions at farm level	0
9.2.	Interventions in the milk processing plant and during distribution	0
9.3.	Combination of preventive practices	0
9.4.	Validation, monitoring, verification of control measures	0
10.	Conclusions	0
	Acknowledgements	0
	References	0

Introduction

1. Background

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations, world milk production reached 724 million tonnes in 2010, resulting in an enormous consumption of and trade in dairy products (FAO, 2011). In this regard, safety and the control/prevention of milk-borne food pathogens are of primary importance to public health. Farmed animals represent a major reservoir of pathogens that can be transferred to milk; the predominant human bacterial pathogens that can potentially be transferred to milk include *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. and pathogenic *Escherichia coli*. Raw milk provides a potential growth medium for these bacteria.

E. coli is a Gram-negative, facultative anaerobe, within the family Enterobacteriaceae, and is normally a commensal bacterium that coexists with its human host in the intestines in a mutually beneficial relationship (Tchaptchet and Hansen, 2011). For the most part, *E. coli* is a group of harmless bacteria that are most often used as indicator organisms for faecal contamination and breaches in hygiene. However, several *E. coli* clones have acquired virulence factors that have allowed them to adapt to new niches and in some cases to cause

serious disease. There are six categories of pathogenic *E. coli* that affect the intestines of humans: Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC); also called verocytotoxin-producing *E. coli* or VTEC), of which enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) are a pathogenic sub-group; enteropathogenic *E. coli* (EPEC); enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); enteroaggregative *E. coli* (EAEC); enteroinvasive *E. coli* (EIEC); and diffusely adherent *E. coli* (DAEC).

Among the pathogenic *E. coli* of greatest relevance to milk is *E. coli* O157:H7, an STEC serotype, which, because of its high virulence (it can cause disease at a dose of 5–50 cells), is of major concern to the dairy industry. According to a recent review (Mathusa et al., 2010), six other non-O157 STEC serogroups are emerging as leading causes of infection: *E. coli* O26, O103, O145, O111, and O91. These serogroups are a small number in the entire family of STEC. Water and foodstuffs that are subject to faecal contamination from ruminants could represent a threat to food safety. In North America, Japan and parts of Europe, most outbreaks have been caused by strains belonging to the serotype O157:H7; however, other serogroups are also an important health concern.

1.2. Purpose of this review

The purpose of this review is to assess the current situation with respect to the major serotypes of pathogenic STEC in dairy products. Twelve years ago, the International Dairy Federation (IDF) established a Task Force comprising scientists involved in research on pathogenic *E. coli* to review and assess the significance of STEC in dairy production with respect to consumer health (Bastian and Sivelä, 2000).

As cheesemaking is a major sector of the dairy industry worldwide, and many cheese varieties throughout the world are typically made from raw or unpasteurised milk with natural enzymes and microflora that are responsible for enhancing desirable flavour characteristics (Fox and McSweeney, 2004), this review has a focus on cheese with respect to pathogenic STEC serogroups.

The review first describes the bacteriological characteristics of STEC, its sources and its mode of transmission. This is followed by a description of the analytical methods, including testing for virulence factors, to detect and identify the human pathogenic STEC strains/serotypes in milk and dairy products. Then the main outbreaks associated with dairy products, the occurrence of STEC in raw milk and cheeses and its survival during cheesemaking are discussed. Finally, measures that can help prevent the contamination of milk and dairy products are proposed. The document focuses on recent advances in the understanding of the strains and/or serotypes that pose a significant risk to human health.

2. Bacteriological characteristics

2.1. Shiga-toxin-producing *E. coli*

E. coli is a micro-organism that is commonly found in the lower intestinal tract of healthy humans and animals. There are many types of *E. coli*, a few of which are potentially pathogenic by a variety of infective and toxin-producing mechanisms. Symptoms vary according to the strain of *E. coli* encountered and the resistance of the individual to such illness. Infants, young children, the elderly and the immunocompromised are generally more susceptible to *E. coli* infections than healthy older children and adults, although the recent *E. coli* O104 outbreak in Germany caused more problems in healthy adults (EFSA, 2011a), indicating that such generalisations do have significant variations. All STECs have the same morphology. They are Gram-negative bacilli belonging to the Enterobacteriaceae family and the *Escherichia* genus. STECs are characterised by their serogroup, virulence genes, toxins and associated disease symptoms. STECs are so named because they produce one or more cytotoxins, called Shiga toxin 1 (stx1) and Shiga toxin 2 (stx2).

2.2. Growth and inactivation

Most *E. coli* grow between 10 and 46 °C, with some strains growing at 8 °C (ICMSF, 1996). However, some STEC serotypes can grow in milk at temperatures as low as 6.5 °C (Kauppi et al., 1996). A recent publication has also shown that *E. coli* O157 strains possess inherent genetic mechanisms which enable growth at low temperatures (<15 °C), compared to non-pathogenic *E. coli* (Vidovic et al., 2011). STECs, like other Gram-negative bacteria, do not exhibit unusual heat resistance under conditions of neutral pH and moderately high water activity (a_w ; e.g. 0.95; Kaur et al., 1998). Pasteurisation of milk at 72 °C for 15 s inactivates O157:H7 (D'Aoust et al., 1988).

2.3. Resistance to environmental stress

In bacteria, stress resistance mechanisms are a common survival strategy. This is particularly relevant to bacterial survival in food. Most survival studies (in food or laboratory media) have been undertaken using *E. coli* O157:H7 strains and little is known about other STEC serotypes.

STEC O157:H7 have been shown to survive at temperatures that are lower than those suitable for growth. For example, *E. coli* O157:H7 can survive for several weeks or months in meat, fruits, ice cream and yoghurt when frozen at –18 to –20 °C (De Schrijver et al., 2008; Doyle and Schoeni, 1984; Grzadzowska and Griffiths, 2001; Strawn and Danyluk, 2010), and outbreaks have been linked to frozen ground beef patties that contained viable *E. coli* O157:H7 (CDC, 1997, 2000).

Environmental stresses can induce thermotolerance in some strains. Exposure to mild heat, or cross-protection induced during acid adaptation, has been reported to increase thermotolerance by up-regulating stress response genes (Murano and Pierson, 1992; Ryu and Beuchat, 1998, 1999; Semanek and Golden, 1998). Fat also has a protective effect against thermal inactivation (Line et al., 1991; Singh and Ranganathan, 1980). Three mechanisms in *E. coli* allow the cells to withstand acid challenge at pH 2.5: the RpoS, the arginine decarboxylase and the glutamate decarboxylase systems (Castanie-Cornet et al., 1999). Acid resistance of STEC is mediated by *rpoS*, which encodes a stationary-phase sigma factor. This feature helps STEC to survive the acidity of the stomach and to colonise the gastrointestinal tract. Furthermore, it also increases the survival of STEC in acidic foods, enabling survival for extended periods, particularly at refrigeration temperature (Meng et al., 2007; Semanek and Golden, 1996). Hence, contaminated cultured and fermented foods such as yoghurt and cheese have been implicated in sporadic cases and outbreaks (Baylis, 2009; Besser et al., 1993; CDC, 1995a, 2000; Cody et al., 1999; Ethelberg et al., 2007, 2009; Hussein and Bollinger, 2005; Hussein and Sakuma, 2005a; King et al., 2010; Sartz et al., 2008; Weagant et al., 1994).

Although there are relatively few published studies evaluating the survival of non-O157 STEC in foods, isolating non-O157 from commercial product suggests that these strains may be equally resistant to stress conditions (Baylis, 2009; Stephan et al., 2008).

Other preservatives have various effects on STEC. Lactate, propionate, sorbate and benzoate inhibit non-O157 STEC but the extent of inhibition or survival is concentration and temperature dependent (Hazarika et al., 2003; McWilliam Leitch and Stewart, 2002a, 2002b).

3. Detection and isolation methods

STECs comprise over 400 serotypes that differ greatly in both their physiological characteristics and their pathogenic potential to humans (Bettelheim, 2007; Scheutz and Strockbine, 2005); at present it is still not possible to fully define human pathogenic STECs (AFSSA, 2010; EFSA, 2007). This diversity is reflected in the use of very different detection methods for STEC in monitoring programmes or official food controls and in the lack of international standardised procedures for detection of non-O157 STEC. Generally, two different approaches are used to detect STEC in foods: 1) serogroup-independent techniques where data on the prevalence of genes and the characteristics of STEC occurring in food is acquired (Beutin et al., 2007; Fach et al., 2001). This can result in isolation of non-disease causing strains. 2) Serogroup-dependent methods which target a subset of serogroups most frequently involved in human disease and outbreaks and focus on STECs likely to exhibit virulence in humans, such as strains belonging to serogroups O26, O45, O91, O103, O111, O121, O145 and O157 (Auvray et al., 2007; EFSA, 2009a; Fratamico et al., 2011; Madic et al., 2009, 2011; Perelle et al., 2007). Food samples contaminated by STEC serotypes that are less frequently associated with human infections, but can still cause cases of HUS (e.g. O113:H21, O174:H21, or the newly emerging O104:H4 serotype; [Scheutz et al., 2011]) are missed by these selective methods.

As *E. coli* O157:H7 is the most prevalent cause of STEC human disease and outbreaks, genetic detection assays and differential/selective agars for its isolation are well developed and widely available for routine analysis. Non-O157 STEC serogroups have also been increasingly linked to food-borne illness outbreaks and severe pathology (see Section 7), and therefore genetic detection methods and differential/selective agars for isolating the most prevalent non-O157 serogroups (i.e. O26, O103,

O111 and O145) have recently been developed. However, as described below, additional method development for these and other STEC serogroups is still required.

3.1. Culture and isolation methods

3.1.1. Enrichment

As food samples usually contain low numbers of STEC together with a high level of competing microflora, a selective enrichment step is required for the isolation of STEC. For processed foods, enrichment may also facilitate the recovery of injured or stressed bacterial cells that have been exposed to harsh manufacturing processes. A wide range of enrichment protocols, which use different basal broths, different added selective agents and different incubation times and temperatures, have been described (Vimont et al., 2006). Although various enrichment protocols have been compared for their ability to support growth of STEC, no clear conclusions could be drawn regarding their relative efficacy (Baylis, 2008; Vimont et al., 2006); to date, there are no standard enrichment conditions for STEC serotypes other than O157:H7. Studies have suggested that all serotypes cannot be detected by one method (Baylis, 2008).

For the detection of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC, tryptone soya broth (TSB) and *E. coli* broth (EC), incubated at 35–37 °C for 16–24 h, are the most frequently employed enrichment media (Vimont et al., 2006). To suppress the antagonistic activity of the background microflora, incubation at 42 °C may be used although this temperature may also interfere with the recovery of injured STEC cells. Enrichment broths are frequently supplemented with selective agents such as potassium tellurite and antibiotics, especially novobiocin (or acriflavin in the case of dairy products). However, it has been reported that systematic addition of novobiocin should be avoided as it may inhibit the growth of some STEC strains (Vimont et al., 2006). Jasson et al. (2009) also showed a susceptibility of STEC O157 to various selective components in the enrichment medium and therefore supported the use of non-selective media, such as buffered peptone water (BPW).

3.1.2. Immunomagnetic separation

By taking advantage of interactions between antibodies and O-antigens, immunomagnetic separation (IMS) can be used, after enrichment and prior to plating, for the selective concentration of STEC cells belonging to particular serogroups. The use of IMS-O157 is well established and is considered to be the official standard method for the detection of *E. coli* O157 in foods and animal feedstuffs (ISO, 2001). It was shown to be effective and applicable to the examination of dairy products, with a detection limit of 1–2 CFU/25 g (Voitoux et al., 2002). Automated IMS technology allowing sample recirculation over a “capture phase” has also been proposed to improve STEC recovery (Fedio et al., 2011).

IMS-based methods have not yet been standardised for the detection of non-O157 STEC. Commercial IMS assays are available for a subset of four non-O157 serogroups most frequently involved in HUS and outbreaks, i.e. O26, O103, O111 and O145. However, the detection of these non-O157 STEC by IMS is subject to serotype-specific variations in capture efficiency (Auvray et al., 2007; Hara-Kudo et al., 2000; Jenkins et al., 2003; Madic et al., 2011; Verstraete et al., 2010).

3.1.3. Selective media

In contrast to commensal *E. coli* strains, typical *E. coli* O157:H7 do not ferment sorbitol, lack the ability to produce β -D-glucuronidase (GUD) and are also more resistant to cefixime and tellurite. Based on one or more of these properties, several solid growth media, including sorbitol-MacConkey (SMAC) agar and its cefixime-tellurite-supplemented formula (CT-SMAC), have been developed (March and Ratnam, 1986; Zadić et al., 1993). Alternative agars, mostly based on chromogenic reactions, distinguishing *E. coli* O157:H7 from background flora, are commercially available. However, these media not only fail to detect all the non-O157 STEC serotypes, but also fail to detect

atypical (HUS-causing) *E. coli* O157:H7/H⁻ strains, which are sorbitol fermenting (SF) and GUD-positive (and therefore called sorbitol-positive/SF O157 [Karch and Bielaszewska, 2001]). In addition, several non-O157 *E. coli* serogroups lack sorbitol fermentation and GUD activity (Manna et al., 2010), which complicates phenotypic identification of *E. coli* O157.

The enterohaemolytic phenotype of a significant proportion of STEC strains has been exploited for the development of an ‘enterohaemolysin agar’ prepared with washed sheep erythrocytes supplemented with Ca²⁺ and vancomycin-cefsulodin-cefixime for increased selectivity. After incubation at 37 °C for 18–24 h, enterohaemolytic colonies are identified by the formation of small turbid haemolytic zones (Beutin et al., 1989). However, it should be stressed that non-haemolytic STEC will be missed on this medium.

As most strains of STEC O26 are unable to ferment rhamnose and, like O157:H7, are also more resistant to cefixime and tellurite, rhamnose-MacConkey (RMAC) agar and RMAC agar supplemented with cefixime and tellurite (CT-RMAC) are often used to differentiate STEC O26 from other *E. coli* (Hiramatsu et al., 2002). Recently, new selective differential and confirmation media, based on a mixture of carbohydrate sources and a chromogenic substrate for β -D-galactosidase, have been developed and evaluated for isolating *E. coli* O26, O103, O111 and O145, as well as sorbitol-positive and -negative O157 STEC at levels of ≤ 100 CFU/25 g (Possé et al., 2008a, 2008b). Overall isolation efficiencies ranged from 100% for raw milk, to 82.3% and 88.5% for cheeses made with pasteurised milk and raw milk, respectively (Possé et al., 2008b). Cold-stressed and non-stressed STEC O26, O103, O111 and O145 inoculated into the cheese samples at levels of 10–30 CFU/25 g were reliably isolated using this procedure. Plating on Rainbow® Agar O157 was also successfully used for isolation of *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 and O145 from artificially contaminated ground beef (Fratamico et al., 2011). Finally, CHROMagar™ STEC (CHROMagar Microbiology) was found suitable for the selective screening of major EHEC serotypes (e.g. O26:H11, O111:H8, O118: H16, O121: H19, O145:H28 and O157:H7) from vegetables (Tzschoppe et al., 2012).

3.1.4. Colony hybridisation and immunoblot assays

Despite the lack of isolation media for the majority of STEC serogroups, suspect *stx*-positive colonies isolated on agar plates can be identified using the DNA probe hybridisation technique (Karch and Meyer, 1989). For the detection of STEC in dairy products, diluted aliquots of enriched cultures, displaying a positive polymerase chain reaction (PCR) result for *stx*, can be plated by spreading onto agar before applying the filter technique for blotting and hybridisation (Fach et al., 2001; Messelhäusser et al., 2008; Parisi et al., 2010; Stephan et al., 2008; Vernozy-Rozand et al., 2005a). Alternatively, identification of STEC isolates can be performed immunologically using anti-Stx antibodies. However, colony hybridisation or immunoblot assays are rather laborious techniques that cannot be easily performed routinely. Moreover, the detection of low numbers of STEC is difficult, as STEC may be outgrown by the background microflora on the agar plates.

3.1.5. Confirmation of suspected colonies

Isolates of STEC have to be confirmed on two levels: the serotype and the production of Stx or the presence of *stx* genes. Several different approaches are used, including serological techniques, tissue culture assay and nucleic acid-based methods.

Traditionally, suspected colonies on selective media are confirmed biochemically as *E. coli* and serotyped. However, large sets of antisera against *E. coli* O-antigens 1–181 and H-antigens 1–56 are restricted to specialised international reference laboratories and only a limited number of O- and H-antigens can be typed using commercial serological kits. The production of active Stx can be tested biologically using the vero cell assay (VCA) (Konowalchuk et al., 1977). Although this assay is considered to be the gold standard, its use in routine diagnostic laboratories is limited because it is time consuming and

requires facilities for cell culture preparation. Commercial immunoassays and reverse passive latex agglutination (RPLA) tests are also available for Stx detection (see: <http://denka-seiken.jp/english/products/bacteriology/escherichiaColi.html>).

Alternatively serotyping and examination of virulence can be achieved using DNA-based molecular diagnostic tools. A large number of conventional PCR tests targeting *stx*, *eae* and genetic markers specific for the O- and H-antigens associated with the main pathogenic STEC serotypes have been developed, including simplex and multiplex assays (Bastian et al., 1998; Botteldoorn et al., 2003; Monday et al., 2007; Paton and Paton, 1998). Real-time PCR methods based on the use of fluorescent dyes or fluorogenic oligonucleotide probes have been proposed, offering interesting advantages, such as quantification, increased speed, prevention of carryover contamination and high throughput automated analysis (Beutin et al., 2009; Bugarel et al., 2010a, 2010b; Fratamico et al., 2009, 2011; Lin et al., 2011; Madic et al., 2010; Nielsen and Andersen, 2003; O'Hanlon et al., 2004; Perelle et al., 2004). DNA microarray technology has also been used for rapid genetic identification of 24 O groups and 47 H types, representing a valuable alternative to classical serotyping (Ballmer et al., 2007).

3.2. Methods for the detection of STEC in food

3.2.1. Culture-based methods

An International Organization for Standardization (ISO) method is available for the detection of *E. coli* O157:H7 in food and animal feedstuffs (ISO, 2001). This method is based on an enrichment procedure, followed by a separation and concentration step, and then an isolation step on selective chromogenic media. It was shown to be sensitive, with a detection limit of 1–2 CFU/25 g, as well as effective and applicable to the examination of dairy products (Voitoux et al., 2002). Methods for standardisation of non-O157 STEC are in the process of being developed.

One of the disadvantages with culture-based methods is that cells can enter a dormancy state where they become non-culturable (viable but non-culturable [VBNC]; Dinu and Bach, 2011). This can lead to an underestimation of numbers or a failure to isolate a viable culture, although the cells may still retain pathogenicity, or be recoverable to a viable cell state. Recovery of cells may be compromised by selective or chromogenic media and VBNC should be considered in using these media.

3.2.2. Molecular-based and immunological methods

Recently, a real-time PCR-based method for detection of pathogenic STEC belonging to serogroups O26, O103, O111, O145 and O157 has been developed by Working Group 6 of Technical Committee 275 of CEN (European Committee for Standardisation) and has since been proposed as a draft International Organization for Standardization Technical Specification (ISO/TS 13136; EFSA, 2009a). It is intended for the analysis of human food and animal feedstuffs, as well as for environmental samples in the area of food production and/or handling and at primary production stages.

Real-time PCR is recognised as a highly specific and sensitive technique that can be completed in 2–4 h after enrichment. Its potential for automation also makes it suitable for the screening of large numbers of food samples. Table 1 includes a list of commercialised real-time PCR tests allowing the detection of *E. coli* O157 or *stx* genes in foods, with analytical performances, approved by AFNOR Validation or AOAC International. Numerous other PCR methods targeting STEC-associated markers have been described in the literature and could be useful for screening food. However, only a few of these include an IAC to detect PCR failures caused by inhibitory food compounds (Auvray et al., 2009; Belanger et al., 2002; Derzelle et al., 2011; Fratamico et al., 2009, 2011; Stefan et al., 2007). In addition, failure of some PCR assays to detect genetically distant *stx* variants has been described (Bastian et al., 1998; Beutin et al., 2009; Reischl et al., 2002). Recently, a quantitative PCR assay designed to detect all known *stx* gene subtypes including the most

Table 1

Validated commercial immunoassays and PCR tests for the detection of *E. coli* O157 or STEC in foods (as at August 23rd 2011).

Principle ^a	Name of the assay (manufacturer)	Validation
AIEA	VIDAS® <i>E. coli</i> O157 (ECO), VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157 (including H7) (bioMérieux)	AOAC/AFNOR
ELISA	Assurance EIA® EHEC (BioControl Systems)	AOAC
	TECRA® <i>E. coli</i> O157 VIA™ (3 M TECRA)	AOAC
LFI	DuPont™ Lateral Flow System <i>E. coli</i> O157 (DuPont Qualicon)	AOAC
	RapidChek® Select™ <i>E. coli</i> O157 (Strategic Diagnostics)	AOAC
	Reveal® 2.0 <i>E. coli</i> O157:H7 test system (Neogen Corporation)	AOAC
	Singlepath® <i>E. coli</i> O157 (Merck/EMD Chemicals)	AOAC
	VIP Gold™ for EHEC (BioControl Systems)	AOAC
MICT	FoodChek™ <i>E. coli</i> O157 (FoodChek Systems)	AOAC
Real-time PCR	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection system for <i>E. coli</i> O157, ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection system for <i>E. coli</i> O157:H7 (AES Chemunex)	AOAC
	Assurance GDS™ Shiga Toxin Genes, Assurance GDS™ <i>E. coli</i> O157:H7 (BioControl Systems)	AOAC
	BAX® <i>E. coli</i> O157:H7 MP, BAX® Real-time PCR assay <i>E. coli</i> O157:H7 (DuPont Qualicon)	AOAC/AFNOR
	<i>E. coli</i> O157:H7 LT Test Kit (Idaho Technology)	AOAC
	Foodproof® <i>E. coli</i> O157 Detection Kit (BIOTECON Diagnostics GmbH)	AOAC
	GeneDisc pathogenic <i>E. coli</i> O157, GeneDisc STEC, GeneDisc EHEC 5 ID (Pall GeneDisc Technologies)	AOAC/AFNOR
	HQS <i>E. coli</i> O157:H7 (ADNucleis)	AFNOR
	IEH <i>E. coli</i> O157, Stx-producing <i>E. coli</i> (STEC) with Intimin (IEH Laboratories and Consulting Group)	AOAC
	iQ-Check™ <i>E. coli</i> O157:H7 (Bio-Rad)	AOAC/AFNOR
	MicroSEQ® <i>E. coli</i> O157:H7 Detection kit (Applied Biosystems)	AOAC/AFNOR

^a AIEA, automated immunoenzymatic assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LFI, lateral flow immunoassay; MICT, magnetic immunochromatographic test.

distant variant *stx2f* was developed and successfully applied for STEC detection in foods such as raw milk cheeses (Derzelle et al., 2011). This assay also proved to be appropriate for the direct quantification of STEC in milk over a 5 log dynamic range, i.e. from 4×10^6 to 40 CFU/mL.

Multiparametric real-time PCR-based approaches targeting several EHEC virulence genetic markers facilitate the identification of food samples contaminated by STECs belonging to various serogroups such as O26, O103, O111, O145 and O157 (Auvray et al., 2007; Perelle et al., 2007) or O26, O45, O103, O111, O121, and O145 (Fratamico et al., 2011). The interest of a sequential molecular strategy for the detection of STEC O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7 in cheeses was also described recently (Madic et al., 2010, 2011). By targeting associations of genetic markers specific for highly pathogenic STEC, such methods help to further refine the diagnostic results obtained from PCR-based analysis of complex food matrices (Fig. 1).

In addition to PCR-based methods, many immunoassays easy to perform in routine laboratories have been developed and validated for the screening of *E. coli* O157 in foods (Table 1). Recently, a lateral flow device capable of detecting STEC serogroups O26, O45, O103, O111, O121 and O145 inoculated at concentrations of 3–6 CFU/375 g of beef after 18 h enrichment at 42 °C has been reported (Nadala and Samadpour, 2011). Further developments of this nature can be expected in the coming years.

In contrast to cultural methods which are time-consuming, labour-intensive, and often associated with a low rate of STEC recovery from food, PCR- or immunoassay-based methods are characterised by reduced analysis time and high-throughput analysis capabilities. In particular, they offer the possibility to quickly rule out negative samples, which represent the majority of food samples (Lynch et al., 2012; Perelle et al., 2007; Thomas et al., 2011). Only samples that test positive require confirmation by cultural methods.

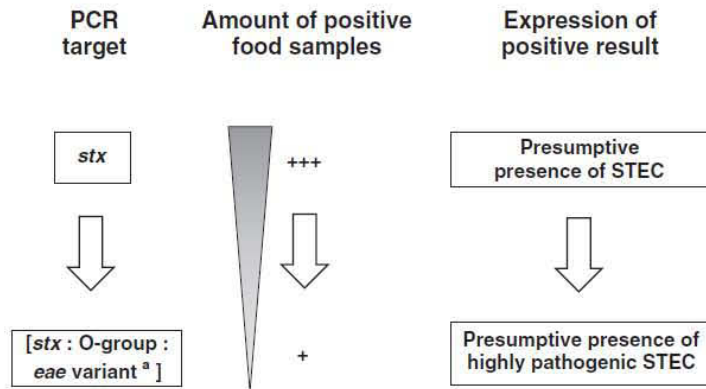


Fig. 1. Schematic presentation of the interest of real-time PCR-based detection of genetic allelic combinations from the main pathogenic STEC for food analysis. ^aCombinations of genetic markers typical of STEC O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7 are *stx*:wzO26:eae-β1, *stx*:wzO103:eae-ε, *stx*:wbd1011:eae-γ2/θ, *stx*:ihp10145:eae-γ1 and *stx*:fjbE0157:eae-γ1, respectively.

A limitation of these rapid screening methods however is that they are restricted to a small number of pathogenic STEC serogroups. Although adaptation of these techniques can be achieved easily for the detection of emerging serotypes such as O104:H4 (Scheutz et al., 2011; Tzschoppe et al., 2012), potentially virulent STEC strains belonging to serotypes less frequently involved in human disease would still remain undetected during routine food analysis. Screening methods targeting virulence gene profiles of EHEC irrespective of their serotypes would therefore seem better suited. Unfortunately, various virulence gene profiles occur among pathogenic STEC strains and the full combinations of virulence factors necessary to cause disease still remain to be defined, which hampers the development of such serotype-independent screening strategies.

3.3. Genetic typing of STEC isolates

Further genetic characterisation of STEC isolates can facilitate epidemiological investigation of outbreaks. Because of its high level of discrimination, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered to be the standard method for the typing of STEC, especially if use of the standardised PulseNet protocol (<http://www.pulsenetinternational.org>) is made. Subtyping of STEC virulence genes using PCR-based techniques, microarrays or DNA sequencing has also proven to be useful for epidemiological and phylogenetic analyses (Nielsen and Andersen, 2003; Oswald et al., 2000; Persson et al., 2007). A number of other techniques, such as multilocus sequence typing (MLST), multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), microarray-based comparative genomic hybridisation (mCGH) and single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, have also emerged as interesting tools to identify genetically related STEC strains and to reveal potential epidemiological relatedness (Laing et al., 2009; Manning et al., 2008; Miko et al., 2010; Noller et al., 2003; Ziebell et al., 2008).

The use of innovative DNA-sequence typing by Bielaszewska et al. (2011) also proved crucial in the rapid identification and typing of the EHEC O104:H4 outbreak isolate, only two days after the first stool arrived in their laboratory. By generating whole-genome sequences in a short amount of time, high-throughput next-generation sequencing technologies yielded critical insights into the causative EHEC O104:H4 strain at the early stages of the German outbreak, such as its high genome sequence similarity to EAEC (Brzuszkiewicz et al., 2011; Mellmann et al., 2011; Rohde et al., 2011). They also allowed a rapid increase in the number of available *E. coli* O157:H7 genome sequences (Eppinger et al., 2011; Rump et al., 2011). Next-generation sequencing technologies will undoubtedly become increasingly popular in the

production of epidemiologically relevant data during outbreaks and in the comprehension of the mechanisms underlying STEC evolution and virulence.

4. Diversity of serotypes, virulence factors and the concept of seropathotypes

The genes encoding the Shiga-toxins (*stx*) are carried by temperate lambdoid phages and therefore can be found independently of *E. coli* strains, i.e. in free phage particles (Schmidt, 2001). Thus, the prevalence of *stx* genes, detected by PCR, does not necessarily reflect the occurrence of a viable *E. coli* isolate containing those genes. However, if there is a high prevalence of *stx*-encoding phages in the farm environment these could potentially generate new STEC pathotypes by transduction (Cornick et al., 2006; Herold et al., 2004; Schmidt, 2001). The relatively low isolation rate of STEC in both animals and dairy products, suggests that such horizontal transfer of *stx*-genes by transduction takes place at a very low frequency. However, the recent large and deadly outbreak of *E. coli* O104:H4 food poisoning in Germany appears to have been caused by such a recombinant event (Scheutz et al., 2011) leading to a highly pathogenic hybrid of EHEC and EAEC (Mellmann et al., 2011) and therefore continued vigilance is necessary.

4.1. Diversity of serotypes and seropathotypes

A large number of *E. coli* serotypes produce Stx. Although numerous outbreaks worldwide have been attributed to O157:H7, more than 380 different STEC O:H serotypes have been implicated in disease (Karmali et al., 2010). Since they are associated with various levels of virulence for humans, these serotypes were classified into five seropathotypes (SPTs) based on their relative incidence in human infections and their association with outbreaks and severe disease including HUS (Karmali et al., 2003; Konczyk et al., 2008; Table 2). In the absence of a consensus definition for the full set of virulence genes required for disease, this SPT-based classification was considered to be a valuable tool for a more precise molecular risk assessment of the human pathogenic potential of non-O157 STEC serogroups (EFSA, 2007).

4.2. Virulence factors

The ability of STEC to cause serious disease in humans is related mainly to their capacity to produce Stx, a family of bacteriophage-

Table 2
Seropathotypes of STEC associated with human illness (Karmali et al., 2003).

Seropathotype	Relative incidence	Frequency of involvement in outbreaks	Association with severe disease ^a	Serotypes
A	High	Common	Yes	O157:H7, O157:NM
B	Moderate	Uncommon	Yes	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Low	Rare	Yes	O91:H21, O104:H21, O113:H21, others
D	Low	Rare	No	Multiple
E	Non-human only	NA ^b	NA	Multiple

^a HUS or haemorrhagic colitis.

^b NA, not applicable.

encoded potent cytotoxins characterised by a high degree of diversity. Based on their antigenic differences, the Stx family has been divided into two groups, Stx1 and Stx2, each containing antigenically related members. According to the subtyping nomenclature established at the 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections (Buenos Aires, 10–13 May 2009), Stx variants include three Stx1 subtypes (Stx1a, Stx1c, Stx1d) and seven Stx2 subtypes (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g). Stx2 is clinically the most important Stx type and the probability of HUS development in infections from strains harbouring *stx2* is higher than that of strains containing either *stx1* or both *stx1* and *stx2* (Friedrich et al., 2002). Stx2a, Stx2c and Stx2d were reported as the subtypes most commonly associated with severe outcomes of human disease (Bielaszewska et al., 2006; Persson et al., 2007).

Other important virulence determinants include the locus of enterocyte effacement (LEE) shared by EPEC. This 35–45 kb pathogenicity island is responsible for the formation of attaching and effacing (A/E) lesions on intestinal epithelial cells (Nataro and Kaper, 1998). It contains the *eae* gene encoding the outer membrane adhesin, intimin, which mediates tight contact between STEC or EPEC and intestinal epithelial cells. At least 18 intimin subtypes have been described on the basis of the variable 3' region of the *eae* gene (Ito et al., 2007). In addition to intimin, the LEE encodes components of a type III secretion system (TTSS) which includes TTSS structural and translocator-proteins (EspA, EspB, EspD), and TTSS effector proteins (EspF-H, EspZ, Map and Tir), which are injected into human cells and subvert host cellular pathways (Garmendia et al., 2005). At least 32 other TTSS-secreted proteins displaying various functions are encoded outside the LEE within cryptic prophages and pathogenicity islands and thus usually referred to as non-LEE-encoded effectors (NLEs) (Dean and Kenny, 2009; Tobe et al., 2006).

Although the LEE island is carried by most EHEC strains, its presence is not essential for pathogenesis, and some *eae* (LEE)-negative strains (referred to as atypical EHEC) can cause HUS and occasional outbreaks (Bonnet et al., 1998; Feng et al., 2001; Karch et al., 2005; Nataro and Kaper, 1998; Paton et al., 1999). Conversely, some serotypes of LEE-positive strains isolated from cattle have never been found in humans, suggesting the importance of other virulence factors (Karmali et al., 2003).

Plasmid-encoded putative virulence factors have been described, although their role in pathogenesis remains unclear. For example, the enterohaemolysin E-hlyA, the serine protease EspP and the catalase-peroxydase KatP are encoded on a megaplasmid found in a large proportion of EHEC strains. However, the gene composition is highly variable in STEC plasmids (Brunner et al., 1999) and none of these factors seems to be critical to causing human illness because some STEC strains lacking *E-hlyA*, *espP* or *katP* have been associated with HUS.

5. STEC sources and routes to raw milk on the farm

Ruminants are the main reservoir of zoonotic STEC (Gyles, 2007), and contamination of dairy products during processing in the dairy plant is rare (Ansary and Kaspar, 1997; Kousta et al., 2010). Yet, of 193 STEC strains found in different studies at the dairy farm level, 24 were involved in human illness (Hussein and Sakuma, 2005a), which emphasises the need for control of STEC in animal reservoirs at the dairy farm. Possible mechanisms for on-farm contamination of raw milk with potentially pathogenic STEC from dairy cows, goats and ewes, are discussed below. Possible measures for preventing the contamination of raw milk and milk products at the farm will be discussed in Section 9.

5.1. STEC excretion by dairy ruminants

5.1.1. Faecal excretion

Recent reviews (Gyles, 2007; Hussein and Sakuma, 2005a) have suggested a wide range of estimates for the prevalence of healthy carriage of STEC in cattle, ranging from 0 to 71% of animals and from 0 to 100% of herds. Many of the studies that were quoted in these reviews measured the total *stx* gene prevalence in cattle, and not necessarily the isolation of a viable culture. Because *stx* genes can be present in non-pathogenic organisms, in phage, or be unassociated with a bacterium, *stx* gene prevalence estimates are an inaccurate estimation of food safety risk unless a viable culture has been obtained (EFSA, 2009a). However, vigilance for the presence of *stx* genes in foods is necessary as their transfer to *E. coli* might lead to newly emerging pathogenic STEC strains. It has also been well documented that, although many *E. coli* may contain *stx* genes, not all are pathogenic to humans (Kaper et al., 2004).

As far as O157 is concerned, one review estimates the prevalence of viable cells ranging from 3 to 8% in herds and from 0.5 to 1% in animals (Meyer-Broseta et al., 2001). According to the 2009 EFSA report (EFSA, 2009b), the average proportion of STEC positive samples, based on the investigation of faeces from 5368 animals, was 2.2%, ranging from 0% to 30%, and the average proportion of STEC O157 positive samples was 0.5%, ranging from 0% to 7.2%. A more recent and extensive study in Belgium found viable O157 isolates in 37.8% of 180 farms using a sampling technique with overshoes (Cobbaut et al., 2009). This latter result can be attributed to a better sampling technique, a specific epidemiology in the country or the improvement of the laboratory methods for detection. In general, it is probably best to keep in mind that STEC can be present, at least occasionally, on most farms (Hancock et al., 2001).

Sheep and goats are also healthy carriers of STEC. In Germany, Beutin et al. (1993) found STEC in 66.6% of 120 sheep and in 56.1% of 66 goats. In Spanish studies, 47.7% of goats from 12 herds (Cortés et al., 2005) and 36% of 1300 sheep from 93 flocks (68% were positive) carried STEC (Blanco et al., 2003). In the above studies, sheep and goats seem to carry different STEC serogroups compared to cattle, with a variety of serogroups identified. Some of these serogroups may be pathogenic to humans, but often they do not harbour the virulence genes, *stx2* and *eae* (Beutin et al., 1993; Blanco et al., 2003; Cookson et al., 2006; Kudva et al., 1996, 1997; Orden et al., 2003; Zschöck et al., 2000). Few O157 strains have been found in sheep and goats (La Ragione et al., 2009), with the exception of a Scottish study in which 42.8% of small ruminants on 14 farms were found positive for O157 (Solecki et al., 2009).

The excretion of STEC by ruminants seems to be sporadic (Heuvelink et al., 1998; Kudva et al., 1997; Mechie et al., 1997; Rahn et al., 1997), but may also be persistent over several months (Frémaux et al., 2006; Geue et al., 2009; Gyles, 2007; Hussein and Sakuma, 2005b; Liebana et al., 2005; Orden et al., 2008; Widiashi et al., 2004). Excretion varies according to the season, peaking in warmer months (Berry and Wells, 2010; Hancock et al., 1997; Heuvelink et al., 1998;

Van Donkersgoed et al., 2001). Individual variations are also seen among cows, and may even differ between cow droppings of the same animal (McGee et al., 2004). Some cows and sheep may be 'high shedders' of O157 (Chase-Topping et al., 2008) and perhaps of other serogroups. Other factors contributing to intermittent excretion include age (Hussein and Sakuma, 2005b), diet (Jacob et al., 2009), housing (Ellis-Iversen et al., 2008; Lejeune and Wetzel, 2007; McGee et al., 2004; Vosough Ahmadi et al., 2007; Wood et al., 2007), stress (Rostagno, 2009), herd size (Erlsson et al., 2005), animal health (Byrne et al., 2003; Orden et al., 2003), geographical area (Lejeune et al., 2006) and previous contamination with STEC strains or other pathogens (La Ragione et al., 2009; Naylor et al., 2007).

5.1.2. Intra-mammary excretion

Although the major source of milk contamination by STEC is undoubtedly faecal (Hussein and Sakuma, 2005b), an intra-mammary source of STEC (pre/sub-clinical mastitis), although controversial, should not be ruled out (Lira et al., 2004; Matthews et al., 1997; Stephan and Kuhn, 1999). For example, some indication of mastitic infection with STEC was seen in a study in Switzerland by Stephan and Kuhn (1999) who found STEC in 3% of milk samples from cows with *E. coli* mastitis, and from a Brazilian study which identified the presence of the *stx* gene in 12% of 182 strains isolated from 2144 milk samples from cows with clinical and sub-clinical mastitis (Lira et al., 2004). In contrast, none of the 123 *E. coli* strains responsible for clinical mastitis cases in France, including recent isolates and some spanning 20 years, carried the *stx* gene (Raynaud et al., 2005). These observed differences between countries may be due to differences in sampling, epidemiological characteristics or antibiotic resistance patterns of the microorganisms responsible for mastitis. STEC are presumably often present on the teats in contaminated herds (Frémaux et al., 2006), and understanding the colonisation of the udder, or lack thereof, and other features exhibited by serotypes, in terms of penetration of and adhesion to the teat canal and the udder, are important.

5.2. Sources and circulation of strains on the farm

It is important to understand STEC acquisition, how such strains circulate on the farm and how the milk may subsequently be contaminated by potentially pathogenic strains.

5.2.1. Acquisition of STEC by cattle and small ruminants on the farm

5.2.1.1. Faeces and effluents. Animal-to-animal transmission is a likely contamination route of STEC within the herd, particularly when members of the herd shed STEC in high numbers (Chase-Topping et al., 2008). In addition, the introduction of newly purchased animals may be a relevant route of transmission, although there is no universal agreement on this (Cobbaut et al., 2009; Galland et al., 2001; Lahti et al., 2003; McGee et al., 2004). Environmental transmission was also shown, for example linked with poor housing conditions (Cobbold and Desmarchelier, 2002; Garber et al., 1999; Mechie et al., 1997; Smith et al., 2001; Williams et al., 2005; Wilson et al., 1993) or due to a long survival period of STEC in effluent and the environment (soil, plants, crops, grain and water), even if on-farm practices such as storage and composting may reduce STEC survival in the effluents (Frémaux et al., 2008b).

Other production animals (pigs, reindeer), pets (cats, dogs), wildlife (rabbits, deer, birds) and pests (flies, rodents) are also potential transmission vectors of STEC within ruminants, or within the farm environment (Berry and Wells, 2010; Beutin et al., 1993; Blanco et al., 2003; Erlsson et al., 2005; Lahti et al., 2003; Nielsen et al., 2004; Synge et al., 2003).

5.2.1.2. Feeds and drinking water. Contamination of feed with potentially pathogenic STEC is unusual and is more likely to occur in the feed trough

than in the actual feed lot (Berry and Wells, 2010). STEC occasional presence in forage and/or concentrate can be limited by good manufacturing practices and appropriate effluent management when the feed is produced on the farm, e.g. for silage (Avery et al., 2004). Pasture can also maintain bacterial circulation by direct faeces deposit onto the ground and/or the spreading of effluents (Frémaux et al., 2008b). Drinking water can contribute to introduction or circulation of STEC within the herd, following direct or indirect faeces contamination, from bedding material, dust, in the trough or directly at the source (Cobbold and Desmarchelier, 2002; Lejeune et al., 2001; Meals and Braun, 2006; Shere et al., 1998, 2002; Van Donkersgoed et al., 2001; Vernozy-Rozand et al., 2002; Vinten et al., 2009). Furthermore, O157:H7 and perhaps other STECs can survive for long periods in water and water troughs (Lejeune et al., 2001), but environmental conditions (temperature and sun) or competitive microflora reduce bacterial numbers in water troughs and on pastures through time (Frémaux et al., 2008b).

5.2.2. Circulation of strains on and between farms

Studying the genotypic diversity of the strains that are circulating on a dairy farm is of great relevance in terms of managing STEC at the farm level. Indeed, if each contamination source is associated with one particular strain, the great diversity of strains found on farms can mean several management actions to target these different sources.

There are two hypotheses about the circulation of STECs on the farm and within the herd:

- Some researchers have found great strain diversity and multiple origins on the same farm (Cobbold and Desmarchelier, 2001; Faith et al., 1996; Frémaux et al., 2006; Galland et al., 2001; Liebana et al., 2005; Mora et al., 2004; Raynaud et al., 2005). Poly-clonality of different strains of *E. coli* coming from different mastitic animals on the same farm has been observed (Wenz et al., 2006).
- Other researchers have observed that one or a few genotypes persist on a farm, sometimes despite significant animal turnover (Lahti et al., 2003; Lejeune et al., 2004; Shere et al., 1998).

It is likely that strain circulation on the farm depends on the size of the farm, its type (feedlot, dairy farm, etc.) and farm practices. Similar strain types have been detected on distant farms, but the means by which the bacteria circulate between these distant farms is not clear (Wetzel and Lejeune, 2006).

5.2.3. Milk contamination

Generally, there are two suggested routes by which potentially pathogenic STEC can contaminate raw milk: (1) rare sub-clinical mastitis causing STEC excretion from the udder (see above); (2) faecal routes (directly or indirectly). It is proposed that lactating dairy animals carry potentially pathogenic STEC in their intestines, excrete it in their faeces, which in turn soils the teats, and the milk could be subsequently contaminated during the milking process. Therefore, limiting faecal contamination during milking is key to managing this pathogen on the farm (Hussein and Sakuma, 2005b). STEC could also potentially persist if milking equipment and pipelines are not adequately cleaned or are not well designed and not well maintained.

As STECs are commonly present in cattle, it is probably impossible to eradicate them; hence, preventive or curative measures have to be found to keep them at an acceptable level on the farm. The main pre-harvesting control measures were reviewed (Berry and Wells, 2010; Lejeune and Wetzel, 2007; Hussein and Sakuma, 2005b), with a special focus on O157:H7 for the latter two. Herd management practices aimed at reduction of faecal excretion (detection of high shedders, probiotics, vaccines, feeding changes, minimising animal stress), limitation of the circulation of the bacteria between farms, within the herd and the environment (housing, including dry bedding, pest control, limiting contact with young stock or wild animals, manure and slurry

management), and minimisation of faecal contamination during milking will help to reduce milk contamination. No distinction between curative control measures taken on a given farm after isolation of a potentially pathogenic STEC strain in the milk, and preventive measures concerning other farms on routine production, was made. This distinction should be considered for further research. Both curative and preventive measures have to be adapted to each specific farm situation and they need to be better evaluated (efficiency) and prioritised, alone or in combination, in different farming systems. Indeed, since a lot of data on STEC at the farm level has come from work on feedlots, more research on dairy farms of different types would be useful. Some of these measures are already in use on raw milk producing farms, for example through guide to good hygiene practices.

Preventive measures for raw milk producing farms must also take into account the preservation of complex microbial ecosystems of the farm, which contain bacteria, yeasts or moulds that are essential for raw milk cheese-making (lactic or ripening bacteria for example) and that may be important in the control of potentially pathogenic STEC as it was shown for other pathogen bacteria (Millet et al., 2006; Raynal-Ljutovac et al., 2006, 2008).

In many countries, quantitative risk assessment and other modelling studies lack data at the farm level (Berry and Wells, 2010), making predictions of STEC in this regard difficult and unreliable (Delignette-Muller et al., 2008). Studies on the prevalence and enumeration of serotypes other than O157 are needed, but due to the generally low numbers of STEC, better methodology is required for enumeration.

6. Occurrence of STEC in raw milk and raw milk cheeses

In recent years, DNA based methods have been used to detect genes encoding pathogenicity and virulence factors, such as *stx1*, *stx2*, *eae* and *EhlyA*, in *E. coli* strains and have become a supplement to traditional culturing and serogrouping of STEC. However, it is important to realise that detection of genes in food does not necessarily imply the occurrence of a viable isolate: recovery of a viable culture is still necessary to categorically state that a sample was 'positive' for a potentially pathogenic strain. It is therefore important to clearly distinguish between 'prevalence' of genes and 'occurrence' of viable strains. In addition, studies on occurrence are not always comparable due to differences in the methodology used for recovery of STEC from food. For milk and cheese, standard and validated methods are available for detection and isolation of STEC O157. However, for the other serogroups there are no universally accepted and validated methods, but pragmatic and different approaches have been applied in different studies.

6.1. Occurrence of STEC in raw milk

The significance of *E. coli* O157:H7 and other STEC for the dairy sector has been previously reviewed (Bastian and Sivelä, 2000; Hussein and Sakuma, 2005b). The occurrence of STEC in raw milk has not changed dramatically over the last 10 years, and is typically between 0 and 2%. Since 2000, the introduction of DNA based methods and the production of additional data from countries and regions outside Europe and US, including the incidence of serogroups other than O157, have made the picture more complex. Several studies have included only a limited number of samples, thus adding to this complexity. These data suggest geographical variations in occurrence of various sero- and genotypes, and that goats and sheep may be reservoirs of STEC in some parts of the world. Virulence gene prevalence in raw milk samples (*stx1* and/or *stx2*) is also in general significantly higher than isolate occurrence (Table 3). Studies from Ireland and USA, showed that virulence gene prevalence in raw milk was 36% and 21%, respectively, while the occurrence of isolates was 0.8% and 3.2%, respectively (Cobbold et al., 2008; Lynch et al., 2012).

Recent studies also show high prevalence of *stx* genes in milk filters (Van Kessel et al., 2011). Results from selected studies on the occurrence of STEC isolates and prevalence of *stx* genes in raw milk are presented in Table 3.

6.2. Occurrence of STEC in cheeses and other dairy products

A selection of recent studies on the occurrence of STEC in cheeses and other dairy products (not including milk) is presented in Table 4. Most of the studies focus on cheeses made from raw/unpasteurised milk. Several of these studies have limitations, mainly due to a small number of samples (typically less than 100). The most comprehensive studies on the occurrence of STEC or prevalence of *stx* in cheese are published in Europe (Coia et al., 2001; Conedera et al., 2004; Pradel et al., 2000; Rey et al., 2006; Stephan et al., 2008; Vernozy-Rozand et al., 2005a; Zweifel et al., 2010). A few dairy products other than cheeses, including cream, ice-cream, yoghurt and butter, have also been studied for the occurrence of STEC. Some studies also indicate that STEC isolates from dairy products in most cases differ from the classical pathogenic genotypes, harbouring *stx1* rather than *stx2* (Pradel et al., 2008). Other studies contradict this (Zweifel et al., 2010).

7. STEC human infection and the main outbreaks associated with milk and dairy products

7.1. STEC in humans

The estimated infectious dose of STEC that can cause an outbreak is very low. A dose of pathogenic *E. coli* O157:H7 of 5–50 viable cells (Betts, 2000) can cause illness. Delignette-Muller et al. (2008) showed that 3×10^3 cells may affect 50% of exposed children under five years of age. The symptoms associated with STEC infection in humans vary from mild to bloody diarrhoea, which is often accompanied by abdominal cramps, usually without fever. STEC infections can result in HUS which is characterised by acute renal failure, anaemia and lowered platelet counts. HUS develops in up to 10% of patients infected with STEC O157 and is the leading cause of acute renal failure in young children. In Europe, in 2009, a total of 242 confirmed STEC cases developed HUS. The STEC serogroup O157 was identified in 47% of reported cases in 0–4 year old children and the STEC serogroup O26 in 15% of these cases (EFSA, 2011b).

Non-O157 infections may also induce a range of other illnesses, from mild gastroenteritis to critical illness, and death, either as sporadic cases or in outbreaks. Due to inadequate analytical methods and epidemiological and laboratory surveillance, non-O157 STEC infections may be under-recognised and under-reported around the world (Hanna et al., 2010).

Reports from public health surveillance studies worldwide indicate that sporadic cases of infection with STEC greatly outnumber outbreak cases (EFSA, 2011b). Strains of O157 cause the majority of disease, but in recent years, improved diagnostic assays for non-O157 serogroups have contributed to an increased appreciation of the incidence of disease caused by non-O157 STEC. In the United States, Johnson et al. (2006) evaluated the emerging clinical importance of non-O157 STEC and concluded that these strains may account for up to 20 to 50% of all STEC infections.

In Europe, the total number of confirmed cases reported in 2009 was 3573 corresponding to an overall notification rate of STEC infection reported by the 25 member states of 0.75 cases per 100,000 population. More than half (51.7%) of reported confirmed human STEC infections were associated with the O157 serogroup and 5.4% with O26 serogroup (EFSA, 2011b). Over the period 2002–2006, more than one-third of STEC illnesses were attributed to non-O157 STEC, with 20% due to five serogroups, i.e. O26, O103, O91, O145 and O111 (EFSA, 2007). Except for O91, these serogroups also accounted for the

Table 3
Selected studies reporting on the occurrence of STEC and prevalence of *stx* genes in raw milk.

Region/country	Sample analysed	STEC ^a isolate occurrence (%) and/or <i>stx</i> gene prevalence (%) (N = number of samples)	Reference
Africa			
Kenya	Raw cow's milk (households)	0.8% (N=432) <i>E. coli</i> O157:H7. One <i>stx1</i> positive strain	Arimi et al. (2005)
	Raw cow's milk (households)	0% (N=260) <i>E. coli</i> O157:H7	Kangethe et al. (2007)
America			
Argentina	Raw cow's milk (bulk tank)	0% (N=150) <i>E. coli</i> O157:H7	Roldán et al. (2007)
Brazil	Raw cow's milk (cattle with mastitis)	12.08% (N=2144) positive for a combination of <i>hly</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> and/or <i>eae</i> gene	Lira et al. (2004)
USA	Raw cow's milk (bulk tank)	0.2% (N=859) <i>E. coli</i> O157:H7	Karns et al. (2007)
	Raw cow's milk (for cheesemaking)	0% (N=67) <i>E. coli</i> O157:H7	D'Amico et al. (2008).
	Raw sheep's milk (for cheesemaking)	0% (N=22) <i>E. coli</i> O157:H7	D'Amico et al. (2008).
	Raw goat's milk (for cheesemaking)	0.75% (N=49) <i>E. coli</i> O157:H7	D'Amico et al. (2008).
	Raw cow's milk (bulk tank)	2.4% (N=248) STEC	Jayarao et al. (2006)
	Raw cow's milk (bulk tank)	3.8% (N=131) <i>E. coli</i> non-O157 harbouring <i>stx2</i> or <i>stx1</i>	Jayarao and Henning (2001)
	Raw cow's milk (bulk tank)	3.2% (N=531) STEC	Cobbold et al. (2008)
	Raw cow's milk (bulk tank)	0.75% (N=268) <i>E. coli</i> O157	Murinda et al. (2002)
	Raw cow's milk (bulk tank)	15.2% (N=536) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Van Kessel et al. (2011)
	Milk filters	51% (N=519) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Van Kessel et al. (2011)
Trinidad	Raw cow's milk (bulk tank at collection centres)	0.8% (N=380) <i>E. coli</i> O157	Adesiyun et al. (2007)
	Raw cow's milk (bulk tank and other sources)	0% (N=933 <i>E. coli</i> isolates) STEC from bulk tank milk	Roopnarine et al. (2007)
Asia			
Turkey	Raw cow's milk (individual animals)	1% (N=100) <i>E. coli</i> O157	Oksuz et al. (2004)
India	Raw cow's milk and milk products	1.8% (N=553) <i>E. coli</i> O157	Sehgal et al. (2008)
China	Raw cow's milk	0% (N=209) <i>E. coli</i> O157:H7	Chao et al. (2007)
Europe			
EU	Raw cow's milk ^b	1.7% (N=1300) in 2008 0.5% (N=1079) in 2007 0.4% (N=3474) in 2006 1.4% (N=3947) in 2005	EFSA (2010)
Spain	Raw goat's and sheep's milk (bulk tank)	10.8% (N=360) STEC 0.3% (N=360) <i>E. coli</i> O157	Rey et al. (2006)
Scotland	Raw cow's milk	0% (N=500) STEC	Coia et al. (2001)
Northern Ireland	Raw cow's milk (bulk tank)	2.14% (N=420) STEC (harbouring <i>stx1</i> , <i>stx2</i> and/or <i>eae</i>)	McKee et al. (2003)
Ireland	Raw milk (bulk tank)	10% (N=20) <i>E. coli</i> O157 (<i>stx</i> negative)	Murphy et al. (2007)
	Milk filters	3.1% (N=161) <i>E. coli</i> O157 (<i>stx</i> positive)	
		2.8% (N=161) <i>E. coli</i> O26 (<i>stx</i> positive)	
	Raw cow's milk	36% (N=120) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Lynch et al. (2012)
		0.8% (N=120) of samples positive for <i>E. coli</i> O157, O111, O26, O103 and/or O145	
	Milk filters	69% (N=117) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	
		1.6% (N=117) of samples positive for <i>E. coli</i> O157, O111, O26, O103 and/or O145	
Netherlands	Raw cow's milk (individual animals)	0% (N=140) <i>E. coli</i> O157	Schouten et al. (2005)
	Milk filters	0% (N=4) <i>E. coli</i> O157	
	Raw cow's milk (bulk tank)	0% (N=13) <i>E. coli</i> O157	
Italy	Raw cow's milk (retailer)	0.6% (N=157) <i>E. coli</i> O126 (<i>stx1</i> and <i>stx2</i> positive, lacking <i>eae</i>) and non-O157	Pontello et al. (2003)
	Raw buffalo milk	0.6% (N=160) <i>E. coli</i> O26 (<i>stx1</i> and <i>stx2</i> positive)	Lorusso et al. (2009)
	Raw goat's milk	1.7% (N=60) <i>E. coli</i> O157:H7	Foschino et al. (2002)
	Raw cow's and goats milk	0.14% (N=144) <i>E. coli</i> O157	Picozzi et al. (2005)
	Raw cow's milk	0% (N=994) STEC	EFSA (2011a)
Greece	Raw cow's milk	2.2% (N=950) <i>E. coli</i> O157	Solomakos et al. (2009)
	Raw goat's milk	0.7% (N=460) <i>E. coli</i> O157	
	Raw sheep's milk	0.8% (N=595) <i>E. coli</i> O157	
	Raw sheep's milk	1% (N=100) <i>E. coli</i> O157:H7	Dontorou et al. (2003)
	Raw goat's milk (individual animals)	12.6% (N=87) <i>E. coli</i> O157:H7	
	Raw sheep's milk (individual animals)	13.8% (N=29) <i>E. coli</i> O157:H7	Zdragas et al. (2009)
Switzerland	Raw cow's milk	0% (N=310) STEC	Stephan and Buehler (2001)
	Raw goat's milk (bulk tank)	16.3% (N=344) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Muehlherr et al. (2003)
	Raw sheep's milk (bulk tank)	12.7% (N=63) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	
France	Raw cow's milk	15% (N=778) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Raynaud et al. (2006)
	Raw cow's milk	4.8% (N=205) of samples positive for <i>E. coli</i> O26, O103, O111, O145 or O157 Genetic markers	Perelle et al. (2007)
	Raw cow's milk	21% (N=205) of samples positive for <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i>	Madic et al. (2009)
		3.4% (N=205) of samples positive for <i>E. coli</i> O91:H21 Genetic markers	
Germany	Raw cow's milk	0% (N=209) STEC	Messelhäuser et al. (2008)
	Raw cow's milk	2.5% (N=403) STEC	Zweifel et al. (2006)
	Raw cow's milk (monitoring at farm)	1.5% (N=337) STEC other than <i>E. coli</i> O157	EFSA (2011b)
Belgium	Raw cow's milk	0.7% (N=143) <i>E. coli</i> O157:H7	De Reu et al. (2004)
The Czech Republic	Milk filters	2% (N=192) <i>E. coli</i> O157:H7	Čížek et al. (2008)
Slovakia	Raw cow's milk	0.4% (N=269) <i>E. coli</i> O157	EFSA (2011a)

^a Culture positive sample with strain harbouring *stx1* and/or *stx2* unless otherwise commented.

^b Most data aimed at detecting *E. coli* O157. Only a few investigations conducted with analytical methods aiming at detecting all serotypes of STEC.

Table 4
Selected studies reporting on the occurrence of STEC and prevalence of *stx* genes in cheeses and other dairy products.

Region/country	Sample analysed	STEC ^a isolate occurrence (%) and/or <i>stx</i> gene prevalence (%) (N = number of samples)	Reference
America			
Peru	Soft cheese made from raw milk	7.8% (N = 102) <i>E. coli</i> O157	Mora et al. (2007)
Venezuela	Telita cheese	2% (N = 100) <i>E. coli</i> O157	Márquez and García (2007)
Asia			
Turkey	White pickled cheese made from raw milk	4% (N = 50) <i>E. coli</i> O157	Oksuz et al. (2004)
Europe			
EU	Cheese made from raw milk	0.2% (N = 2876) STEC in 2005 2.4% (N = 1064) STEC in 2006 0.5% (N = 1961) STEC in 2007 1.8% (N = 700) STEC in 2008	EFSA (2010)
Belgium	Cheese made from raw cow's milk Cheese made from raw goat's and sheep's milk Butter and cream made from raw milk Butter, yoghurt, cheese, ice cream and fresh cheese made from raw milk	5.6% (N = 71) <i>E. coli</i> O157:H7 0% (N = 222) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 181) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 64, N = 9, N = 16, N = 7, N = 4 resp.)	De Reu et al. (2002) Imberechts et al. (2007) De Reu et al. (2004)
Italy	Cheese made from raw milk Cheese made from pasteurised milk Mozzarella cheese made from raw buffalo's milk Dairy products from pasteurised cow's milk Dairy products from raw cow's milk Dairy products from pasteurised sheep's milk Dairy products made from raw sheep's milk Mozzarella cheese made from buffalo milk	0% (N = 143) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 60) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 93) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 657) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 811) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 477) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 502) <i>E. coli</i> O157 0% (N = 501) <i>E. coli</i> O157	Civera et al. (2007) Martucciello et al. (2008) Conedera et al. (2004)
Portugal	Cheese made from raw cow's, sheep's and goat's milk	0% (N = 70) <i>E. coli</i> O157	Almeida et al. (2007)
Spain	Dairy products from raw ovine and caprine milk (milk, cheese curd, cheese) Fresh cheese curds (ovine/caprine) Cheese Raw ewe's Castelano cheese (long-ripened, hard cheese)	1.8% (N = 502) STEC (45 <i>stx</i> + samples) 0% (N = 103) STEC (4 <i>stx</i> + samples) 0% (N = 39) STEC (2 <i>stx</i> + samples) 2.4% (N = 84) STEC	Rey et al. (2006)
Scotland	Cheese made from raw cow's milk	0% (N = 739) <i>E. coli</i> O157	Caro and Garcia-Armesto (2007) Coia et al. (2001)
Switzerland	Cheese (semihard, hard and soft) made from raw cow's and goat's milk Cheese (semihard, hard and soft) made from raw cow's, goat's and ewe's milk	2% (N = 796) STEC (4.9% <i>stx</i> + samples) 1.9% (N = 1502) STEC (5.7% <i>stx</i> + samples)	Stephan et al. (2008) Zweifel et al. (2010)
France	Cheese made from raw milk Cheese (soft, hard, unripened, blue mold) made from raw milk Cheese Cheese made from raw milk Cheese made from raw milk	11.7% (N = 180) STEC (30.5% <i>stx</i> + samples) 13.1% (N = 1039) STEC 1% (N = 603) STEC (10% <i>stx</i> + samples) 27.7% (N = 112) <i>stx</i> + samples 5.5% (N = 400) STEC, including 1.8% STEC O26:H11 (29.8% <i>stx</i> + samples)	Fach et al. (2001) Vernozy-Rozand et al. (2005a) Pradel et al. (2000) Auvray et al. (2009) Madic et al. (2011)
Germany	Cheese made from raw cow's milk	0.48% (N = 209) STEC	Messelhäuser et al. (2008)

^a Culture positive sample with strain harbouring *stx1* and/or *stx2* unless otherwise commented.

majority of non-O157 serogroups associated with HUS (Table 5). The distribution of STEC infections in 2009, as in previous years, followed a seasonal pattern, with a rise in case counts over the summer and

autumn months, peaking in September (EFSA, 2011b). Regional differences may also occur; for example, STEC O157 is more frequently linked to human infections in the UK and Ireland than in continental Europe where non-O157 STEC serogroups predominate.

Table 5
The most commonly reported STEC serogroups amongst EU member states over the period 2002–2006 for human and HUS cases in which serogroups were established.

	All human cases		HUS cases	
	No. ^a	%	No. ^a	%
O157	7227	66.0	310	68.3
O26	732	6.7	52	11.5
O103	603	5.5	20	4.4
O91	425	3.9	1	0.2
O145	312	2.8	27	6.0
O111	180	1.6	18	4.0
O146	153	1.4	0	0.0
O128	93	0.8	1	0.2
O55	74	0.7	3	0.7
Other	1199	10.9	22	4.9
Total	10,998		454	

^a Each value represents the sum, for each serogroup, of the numbers of cases reported each year over the period 2002–2006 (EFSA, 2007).

7.2. Different vehicles of human infection

The primary vehicles of transmission are associated with ruminants, which are the main reservoir of STEC. They include contact with animals or their environments and consumption of contaminated food and water (Table 6), although person–person contact has been reported as the cause of about 29% of outbreaks (Kaspar and Doyle, 2009). The foodborne route often involves consumption of undercooked meat, water, dairy products made from raw milk or post-processing contamination of raw or under cooked vegetables and ready-to-eat food. In 18.8% of non-O157 outbreaks, no vehicle was identified.

The latest data from EFSA (EFSA, 2011b) shows that bovine meat is believed to be a major source of foodborne STEC infections for humans. Raw cow's milk is also considered a source of human STEC infections in Europe. In North America, a large number of outbreaks of STEC O157 infection have been attributed to vegetables (CDC, 2006; Hilborn et al., 1999; Wendel et al., 2009).

Please cite this article as: Farrokh, C., et al., Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production, International Journal of Food Microbiology (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>

Table 6
Comparison of the relative importance of transmission vehicles associated with outbreaks of *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 STEC infection. From Kaspar and Doyle (2009).

Vehicle	Non-O157:H7 STEC	<i>E. coli</i> O157:H7
Animal contact	6.2%	9.7%
Water	10.0%	25.6%
Person–person contact	28.8%	6.8%
Dairy	10.0%	12.5%
Meat	11.2%	24.6%
Produce	6.2%	9.2%
Other food	8.8%	5.8%
Unknown	18.8%	5.8%

7.3. Foodborne STEC infections and outbreaks

When interpreting data on the occurrence of STEC from food or animals, it is important to remember that, due to differences in sampling strategies and analytical methods used, data from different investigations are often not directly comparable, especially those between countries and different years. Furthermore, the most widely used analytical method only aims at detecting *E. coli* O157, and there are relatively few investigations aimed at detecting other STEC serogroups.

Table 7 shows the STEC outbreaks that have been linked to milk and dairy products. Raw milk consumption (cow's and goat's milk) has been associated with several cases in Europe, USA and Canada. Most of these were associated with *E. coli* O157, although other serotypes or serogroups, including O22:H8, O110:H⁻, O80:H⁻, and O145 have also been identified as causative agents. Consumption of contaminated soft and semi-soft cheeses has also been implicated in outbreaks, especially those made from unpasteurised cow's and goat's milk. *E. coli* O157:H7 was linked to the majority of cases, but O27:H20, O103, O26, O145, O119:B14, O27:H20, and O104:H21 have also been implicated. The number of reported outbreaks due to non-O157 STECs remains relatively low, probably due to lack of investigation and also to lower pathogenicity.

A number of STEC outbreaks associated to pasteurised milk (Upton and Coia, 1994) and cheese (Nooitgedagt and Hartog, 1988) have been reported. These were probably due to defective pasteurisation and/or post processing contamination. Farm yoghurt, farm ice-cream and milk shakes made with pasteurised milk have also been associated with STEC outbreaks (Becker, 2005; De Schrijver et al., 2008; Morgan et al., 1993). A HUS-outbreak (5 cases) caused by O145:H28 and O26:H11, and associated with dairy farm ice-cream made from pasteurised milk has been recently described (Buvens et al., 2011). Indistinguishable isolates from patients, ice-cream leftovers and environmental farm samples (hay, dust, calf faeces, overshoes) were found. This outbreak was probably the result of a post-pasteurisation contamination of the ice-cream manufactured at the dairy farm. It was estimated that approximately 400 cells of STEC O145:H28 had been ingested by the patients (the concentration of STEC O26 was 100-fold lower in the ice-cream leftovers).

8. Survival of STEC during cheesemaking

There are many varieties of cheeses produced which are categorised into four types: soft, semi-soft, semi-hard and hard cheeses. The different processing technologies used in the various cheeses can influence the survival of *E. coli*. While the processing technology may create conditions that are unsuitable for growth of *E. coli*, they may not cause inactivation and survival may still be an issue. Peng et al. (2011) have reviewed stress response mechanisms important for allowing STEC to survive raw milk cheese production. Some cheeses, however, particularly soft and semi-soft cheeses, are prone to surface contamination where ripening can

result in changing physico-chemical characteristics that may allow greater survival or even growth. Thus, while control of the cheesemaking process is important, process control during ripening is equally important.

8.1. Factors affecting growth and survival of STEC during cheesemaking

The microbial stability of cheese is determined by the combined application of different microbial hurdle factors (low pH, a_w values, NaCl, starters) which become more and more challenging during the manufacturing process (Leistner, 1995). Nevertheless, several studies have shown that the application of each individual hurdle factor may not eradicate STEC. Different authors have demonstrated that survival of *E. coli* strains can be enhanced by cross-protection when subjected to combinations of stresses such as acid, salt and heat stress (Rowe and Kirk, 1999). But it can be conjectured that a synergistic effect of these different hurdle factors exists in cheese (Gálvez et al., 2007) and that the sequence of application of different hurdles is important. The majority of studies on growth/survival of STEC in cheese have been undertaken on *E. coli* O157:H7 and little is known about non-O157 STEC strains.

8.1.1. pH

During the cheesemaking process, lactic acid bacteria produce acids that lead to a decrease in the pH of the cheese which can reach values as low as 4.5 (e.g. lactic cheeses, cream cheeses, or Feta; Mahaut et al., 2000). Several studies have shown that *E. coli* O157:H7 has an optimum growth at pH of around 7 and is able to grow in a pH range between 4.5 and 9 (Dineen et al., 1998; Glass et al., 1992). Furthermore, some strains of *E. coli* O157:H7 are acid-resistant, being able to withstand pH values as low as 3.0 (Jordan et al., 1999). Thus, due to clearly defined acid resistance systems (Foster, 2004), the lowest pH of cheese will not inactivate *E. coli* O157:H7 or other STEC. Acid adaptation to the non-lethal pH in the cheese may promote greater survival of *E. coli* O157:H7 during passage through the acid environment of the stomach (Jordan et al., 1999).

8.1.2. Temperature

In cheese processing, pasteurisation of milk is an effective treatment for inactivating pathogens, including STEC. Early studies revealed that the pasteurisation of milk at 72 °C for 16 s was sufficient to eliminate *E. coli* O157:H7 (D'Aoust et al., 1988). Therefore, the significance of STEC in cheese refers to raw milk cheese or situations where there was pasteurisation failure or post-pasteurisation contamination (Baylis, 2009). For Mozzarella cheese, heating processes during manufacture (80 °C for 5 min) will inactivate STEC (Spano et al., 2003). The effect of sub-pasteurisation heat treatment of milk, however, can have varying effects such as induction of an adaptive response (Usajewicz and Nalepa, 2006). Moreover, the fat molecules may protect STEC during such heat treatment (Erickson and Doyle, 2007; Kaur et al., 1998). The ripening temperature may influence survival, however, *E. coli* O157:H7 was shown to survive for 60 to 75 days, respectively, in Camembert and Feta cheeses at 2 °C (Ramsaran et al., 1998). The same survival results were observed in Cheddar for 60 days at 7 °C (Schlesser et al., 2006).

8.1.3. Water activity (a_w) and salting

During cheese manufacturing, a salting step is usually applied to provide a supplementary drainage of whey, add to the flavour characteristics, help the rind formation and to regulate the a_w in order to control microbial growth (Mahaut et al., 2000). The minimum a_w for growth of *E. coli* is 0.945–0.95 (Lindblad and Lindqvist, 2010; Salter et al., 2000; Sperber, 1983). It has also been shown that in TSB (tryptone soya broth), *E. coli* O157:H7 was inhibited by NaCl at concentrations ≥ 8.5 g/100 g but that it could grow in the presence of NaCl at 6.5 g/100 g (Glass et al., 1992).

Table 7
STEC outbreaks associated with milk and dairy products.

Year	Dairy product	Serotype, virulence factors	Number of cases	Country	References
1986	Raw milk	O157:H7	2 HUS	USA	Martin et al. (1986)
1989	Raw milk	O22:H8	1 HUS	Germany	Bockemühl et al. (1990)
1990	Raw milk	O157:H7	2 HUS	USA (Washington)	Wells et al. (1991)
1991	Farm yoghurt (pasteurised milk)	O157:H7	16–5 HUS	UK (England and Wales)	Morgan et al. (1993)
1992–1993	Farm fresh goat's and cow's milk cheese (raw milk)	O119:B14, VT2	4 HUS	France (Cher)	Caseneuve et al. (1993), Deschênes et al. (1996)
1992–1993	Raw milk	O157:H7	14–0 HUS	USA (Oregon)	Keene et al. (1997)
1993	Milk	O157	7–3 HUS	UK (England and Wales)	Ammon (1997), Wall et al. (1996)
1994	Pasteurised milk	O157:H7, VT2 + PT2	>100–9 HUS	UK (Scotland)	Upton and Coia (1994)
1994	Farm raw milk cheese	O157, VT2, PT28	22–1 HUS	UK (Scotland)	Ammon (1997), Strachan et al. (2006)
1994	Milk	O157, VT2	8–3 HUS	UK (Scotland)	Ammon (1997)
1994	Farm fresh goat's milk cheese (raw milk)	O103	4 HUS	France (Ardèche)	Decludt (1995)
1994	Milk (post pasteurisation contamination suspected)	O104:H21	11 confirmed, 7 suspected	USA (Montana)	CDC ² (1995b)
1995	Farm raw goat's milk	O157:H7	4 HUS	Czech Republic	Bielaszewska et al. (1997)
1996	Raw milk cheese	O110:H ⁻	3–0 HUS	Germany	Bockemühl and Karch (1996)
1996	Milk	O157	12–1 HUS	UK	Clark et al. (1997)
1997	Unpasteurised milk	O157	6	Finland	Lahti et al. (2002)
1997	Unpasteurised milk	O157	3 HUS	Finland	Lahti et al. (2002)
1997	Unpasteurised milk	O157	2 HUS	Finland	Lahti et al. (2002)
1997	Cheese	O157	5 (2 confirmed)	UK	Strachan et al. (2005)
1998	Unpasteurised milk	O157	17	Finland	Lahti et al. (2002)
1998	Unpasteurised farm cheese	O157	4	UK (Scotland)	Strachan et al. (2006)
1998	Raw milk cheese	O157, PT2, VT2	10–1 HUS	UK (Dorset)	CDSC ¹ (1998b)
1998	Unpasteurised cream	O157:H7	7	UK (England)	CDSC ¹ (1998a)
1998	Fresh cheese curds	O157:H7	55–2 HUS	USA (Wisconsin)	CDC ² (2000)
1999	Farm milk	O157	38–3 HUS	UK (North Cumbria)	Anonymous (1999)
1999	Homemade goat's milk cheese (raw milk)	O157, PT 21, PT 28	27–1 HUS	UK (Scotland)	Curnow (1999)
1999	Raw milk	O157	3	UK (Scotland)	Strachan et al. (2006)
2000	Raw milk	O157	2	UK (Scotland)	Strachan et al. (2006)
2001	Raw goat's milk	O157:H ⁻ , sorbitol+ Stx2+, Stx2c+	2–1 HUS	Austria	Allerberger et al. (2001)
2001	Goat's milk	O157:H7	5–2 HUS	Canada (British Columbia)	McIntyre et al. (2002)
2002–2003	Raw milk gouda	O157:H7	13–2 HUS	Canada (Alberta)	Honish et al. (2005)
2003	Raw cow's milk	O26:H ⁻ , stx2+, eae + hly+	2 HUS	Austria	Allerberger et al. (2003)
2003	Raw cow's milk	O157, stx2+, eae + ehxA +	9–4 HUS (family outbreak)	Slovakia	Liptakova et al. (2004)
2003–2004	Organic milk	O157:H ⁻	25–0 HUS	Danemark	Jensen et al. (2006)
2004	Raw milk cheese	O157:H7	3	Canada (Quebec)	MAPAQ ³ (2004)
2004–2006	Farm fresh goat's cheese (raw milk)	O157, stx2+, eae +	2 HUS	France	INVS ⁴ (2004), Espié et al. (2006)
2005	Milk	O157:H7	6	Canada (Ontario)	Honish et al. (2005)
2005	Milk shake	O157:H7	16–1 HUS	Canada (Alberta)	Becker (2005)
2005	Raw milk	O157:H7	18–4 HUS	USA (Washington–Oregon)	CDC ² (2007a)
2005	Raw milk cheese (brie)	O26, O80, stx2+, eae +	6 HUS	France (Normandie)	INVS ⁴ (2007)
2006	Raw milk	O80:H ⁻ , stx1+, eae + hly+, O145, stx1+, stx2+ eae +	59–1 HUS	Germany	RKI ⁵ (2008)
2006	Raw cow's milk	O157:H7	2 HUS	USA (California)	Buglino et al. (2008)
2006	Organic raw milk and cow's colostrum	O157:H7, other STEC serotypes	6–2 HUS	USA (California)	CDC ² (2008)
2007	Farm ice cream	O145:H28, stx2+, eae + ehxA + O26:H11, stx1+, eae + ehxA +	12–5 HUS	Belgium	De Schrijver et al. (2008), Buvens et al. (2011)
2007	Pasteurised cheese	O121, O26, O84	135–10 HUS	USA (Colorado)	CDC (2007b)
2008	Raw goat's milk	O157:H7	4–1 HUS	USA (Missouri)	Marler (2009)
2009	Raw milk	O157:H7, O121	3	USA (Washington)	Food Poison Journal (2009)
2010	Raw milk	O157:H7	8–1 HUS	USA (Minnesota)	Minnesota Department of Health, 2010
2010	Raw goat's milk	O157:H7	30–2 HUS	USA (Colorado)	Marler (2010)
2010	Gouda cheese	O157:H7	38–1 HUS	USA (5 states)	CDC ² (2010)
2010	Raw milk cheese	O157:H7	8	USA (4 states)	Rothschild (2010)

Stx = VT Shiga-toxin (= verocytotoxin)

stx Shiga-toxin gene

HUS Haemolytic Uremic Syndrome

1– CDSC Communicable Disease Surveillance— USA

2– CDC Centers for Disease Control and Prevention— USA

3– MAPAQ Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation du Quebec

PT Phage Type

4– INVS Institut de Veille Sanitaire — France

5– RKI Robert Koch Institut.

8.1.4. Anti-microbial interactions

Milk microflora as well as starter lactic acid bacteria may act antagonistically against STEC strains (Dineen et al., 1998), although little is understood about the mechanisms of these interactions. The specific

antimicrobial mechanisms of lactic acid bacteria that could inhibit pathogenic *E. coli* include the production of organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and production of bacteriocins (De Vuyst and Vandamme, 1992).

Please cite this article as: Farrokh, C., et al., Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production, International Journal of Food Microbiology (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>

Little is known about interactions with other STEC serogroups, or between *Penicillium* spp. and STEC in blue cheeses or with propionibacteria.

8.2. Behaviour of STEC during cheesemaking

8.2.1. Survival/growth during cheese manufacture

If present in cheese, STEC will generally be at low numbers. However, these low numbers are difficult to detect (Jordan and Maher, 2006) and experiments are often undertaken with higher inoculation levels (Montet et al., 2009; Ramsaran et al., 1998; Reitsma and Henning, 1996). In addition, it is difficult to compare results obtained from different studies as many authors use different protocols for analysis.

At the initial stages of cheesemaking, the temperature (30 °C) and a_w value (0.99) of milk are ideal for the growth of *E. coli* O157:H7 and other STEC. During the transition from milk (liquid) to curds (solid), there is an approximately 10-fold increase in the numbers of *E. coli* O157:H7 due to the entrapment of the pathogen in the curds after whey drainage. As CFU/mL for milk and CFU/g for cheese are often plotted on the same graph (Morgan et al., 2001; Papageorgiou and Marth, 1989; Ryser and Marth, 1987a, 1987b), any apparent increase in numbers could be due to growth or cell concentration during curd formation – it is not possible to distinguish between these two phenomena. By plotting all counts in similar units of CFU/g dry weight, Maher et al. (2001) demonstrated actual growth of *E. coli* O157:H7 in a semi-soft laboratory scale cheese during the initial stages of manufacturing. Most authors have reported an increase in numbers of STEC during the initial phase of cheesemaking, however in the absence of consistent units on the graph, this increase could be due to either growth of *E. coli* O157:H7 during cheesemaking, or to concentration of the bacteria during curd formation. In soft cheese such as Feta and Teleme, studies have shown (Govaris et al., 2002) that after inoculation of O157:H7 into pasteurised ewe's and cow's milk, an increase in the concentration of the STEC during the first 10 h of manufacturing was observed. Hudson et al. (1997) also observed that 3 h after curd formation, counts of *E. coli* O157:H7 increased by 1 log CFU/g in the curds of Feta cheese made from cow's milk. Ramsaran et al. (1998) have shown similar behaviour of *E. coli* O157:H7 during manufacture of Feta and Camembert in raw and pasteurised milk by using nisin producing starters. Montet et al. (2009) showed that in Camembert, after inoculation of 3 log CFU/mL of non-*E. coli* O157:H7 STEC in milk, STEC increased by 1 to 2.2 log CFU/g during the first steps of the cheese manufacturing. Hudson et al. (1997) reported that *E. coli* O157:H7 increased during the manufacture of Colby, Cottage, and Romano cheeses, while Wahi et al. (2006) reported that *E. coli* O157:H7 decreased rapidly, but some cells survived during the manufacturing process of Paneer, which is a popular cheese in India.

8.2.2. Survival during cheese ripening and storage

As mentioned earlier, during ripening and storage, the behaviour of the STEC can be affected by the microbial hurdles found in cheese. Generally, there is a decline in the numbers of *E. coli* O157:H7 during cheese ripening, although the rate of this decline will vary. In Feta cheese and Teleme, *E. coli* O157:H7 was not detectable after 44 and 36 days ripening, respectively (Govaris et al., 2002), although Ramsaran et al. (1998) observed that, with an inoculation level of 10^4 CFU/mL, the pathogen population in the cheese was more than 10^6 CFU/g after 75 days of refrigerated storage. Hudson et al. (1997) observed a 3-log cycle reduction in counts of *E. coli* O157:H7 after 27, 30, and 27 days for Colby, Romano, and Feta cheeses, respectively.

Reitsma and Henning (1996) produced Cheddar cheese from milk contaminated with high (10^3 CFU/mL) and low (1 CFU/mL) inocula of *E. coli* O157:H7, and studied the fate of the pathogen in the cheese during ripening at 4 °C. They found that the pathogen survived for 158 days for the high inoculum trial, but it was not detectable after 130 days for the low inoculum trial. In raw goat's milk cheeses, Vernozy-Rozand et al.

(2005b) reported that *E. coli* O157:H7 was detectable even after 42 days of storage, when the milk was initially inoculated with 10, 100 or 1000 CFU/mL. Govaris et al. (2001) reported that *E. coli* O157:H7 could grow during storage at 12 °C in Myzithra, Anthotyros and Manouri whey cheeses within a pH range of 6.3–5.2. D'Amico et al. (2010) have demonstrated the growth and survival of two *E. coli* O157:H7 strains during the manufacture of Gouda and Cheddar cheeses made with raw milk inoculated with 1.3 log CFU/mL of the different *E. coli* O157:H7 strains. These strains remained detectable after enrichment for more than 270 days in both cheeses. It may be concluded that the rate of inactivation of *E. coli* O157:H7 during the ripening time of cheeses could be also depend on the strain and cheese type.

There are few reports in the literature concerning non-O157 STEC, although Montet et al. (2009) found that non-O157 STEC strains survived in Camembert-type cheese during ripening for up to 20 days.

8.2.3. New technologies for the control of STEC in cheese

The application of new technologies may be promising for the control of STEC in cheese. Rodriguez et al. (2005) found that pressurisation at 300 MPa for 10 min at 10 °C, on cheese produced with various bacteriocin starters, reduced *E. coli* O157:H7 to undetectable or levels only detectable by enrichment after 60 days of ripening. After inoculation of *E. coli* O59:H21 and O157:H7 to the curd of a cheese model, high hydrostatic pressure of 400 or 500 MPa decreased the populations of both *E. coli* strains (De Lamo-Castellví et al., 2006).

In general, even with low initial levels of inoculation, *E. coli* O157:H7 (and probably other STEC) can grow during cheese manufacture and survive during cheese ripening at levels high enough to be considered a public health threat (Maher et al., 2001; Montet et al., 2009; Reitsma and Henning, 1996). Therefore, the absence of *E. coli* O157:H7 and other STEC/EHEC from milk destined for cheese manufacture, where there is no inactivation process (such as pasteurisation), is a necessary control measure.

9. Measures for preventing contamination of milk and milk products

As stated in the previous sections, the main reservoir of STEC is the ruminant alimentary tract; bacterial cells are excreted in faeces and primarily contaminate udders, teats and hides (Nastasijević et al., 2008), and the farm environment where they can persist (Frémaux et al., 2006). Secondly, they can contaminate milking machines and milk lines (Čížek et al., 2008; Murphy et al., 2007) and finally the milk (Anonymous, 2003; Grace et al., 2008) and processed products such as raw milk cheeses (Anonymous, 2003; Baylis, 2009; CDC, 2000; Deschênes et al., 1996; Djuretic et al., 1997; Ercolini et al., 2005; Honish et al., 2005; Ramsaran et al., 1998; Schlessler et al., 2006; Vernozy-Rozand et al., 2005a). Outbreaks can occur from the consumption of these products and also from consumption of recontaminated pasteurised milk or dairy products made from pasteurised milk. There is a comparatively higher risk when milk is pasteurised on the farm (Buvens et al., 2011; Clough et al., 2009).

In order to mitigate against contamination of milk by STEC, several intervention strategies have been explored, either alone or in combination. Such strategies include hygiene practices, prophylaxis, feeding, and consumer information. However, the lack of scientific knowledge on the diversity and the resistance of STEC strains, and the high within- and between-herd heterogeneity of faecal shedding complicates the selection of targeted interventions (Matthews et al., 2006; Frémaux et al., 2006; Frémaux et al., 2007a, 2007b, 2008a, 2008b; Son et al., 2009).

9.1. Interventions at farm level

The primary defence against STEC contamination of milk is milking hygiene, resulting in limiting faecal contamination of the teats, although removal of the natural teat skin microflora should be limited as it contributes to cheese technology and organoleptic quality of some raw

milk cheeses. Faecal contamination is less probable for sheep and goats than for cows (Beutin et al., 1993; Blanco et al., 2003), as their faeces tend to be more solid.

Where the possibility of contamination from the environment is high, hygienic milking can be insufficient and a number of additional intervention strategies (reviewed by Berry and Wells, 2010) have been suggested in an attempt to decrease the faecal excretion, including detection and isolation of high shedders of STEC (Chase-Topping et al., 2008), prophylaxis/vaccination (Asper et al., 2007; Bretschneider et al., 2007; Dziva et al., 2007; Judge et al., 2004; McNeilly et al., 2008, 2010; Peterson et al., 2007a, 2007b; Sargeant et al., 2007; Smith et al., 2008; Thomson et al., 2009; Thornton et al., 2009), use of probiotics, antimicrobials, sodium chlorate or bacteriophages (Callaway et al., 2004, 2009; Khanna et al., 2008; Loneragan and Brashears, 2005; Sargeant et al., 2007; Rozema et al., 2009) or altering diet (Callaway et al., 2009; Jacob et al., 2009).

To decrease the level and the circulation of STEC on the farm, other interventions have also been attempted as described previously (Anonymous, 2004, 2007a, 2008; CAC, 2004). However, with the current state of scientific knowledge, it is not possible to determine which measure(s) should have priority. Indeed, total eradication of STEC from the farm environment is not possible because of the high prevalence in cattle herds (Collins and Wall, 2004; Hancock et al., 2001).

Where the raw milk is intended for production of raw milk product, selection of farms and involvement and specific skills of producers are recommended and must be considered together with the preservation of the natural microbial population of raw milk.

9.2. Interventions in the milk processing plant and during distribution

There is no specific measure other than pasteurisation that would target STEC reduction during processing (Anonymous, 2004). Therefore, the usual good hygienic practices (GHP) apply, as recommended in guidelines, as well as application of the HACCP principles.

Little work has been carried out on STEC biofilm development within the dairy context, although like other bacteria, *E. coli* O157:H7 is able to attach to and form biofilms on surfaces which are commonly used in food processing environments, such as stainless steel (Dewanti and Wong, 1995; Ryu and Beuchat, 2005). However, this ability seems to be highly strain dependent, and strains which naturally display an enhanced tendency for biofilm development produce curli or fimbriae-like structures (Cookson et al., 2002; Ryu et al., 2004) and the presence of other bacterial populations on a surface may enhance biofilm development of *E. coli* O157 strains (Marouani-Gadri et al., 2009). Biofilm cells are also more resistant to the antimicrobial effects of disinfectants (sanitisers), such as chlorine, than their planktonic counterparts (Ryu and Beuchat, 2005). Studies have indicated that adequate inactivation of biofilm cells of *E. coli* O157:H7 can be achieved when using combination alkaline cleaners coupled with hypochlorite wash solutions (Sharma et al., 2005).

Technological steps, such as micro-filtration or pasteurisation, can decrease the contamination level at processing. These technological measures should be adapted to the type of milk product (e.g. soft vs. hard cheese) after a hazard analysis process. It should be remembered that, as far as raw milk products are concerned, some measures that are efficient in the management of other pathogenic bacteria, such as long term ripening (Schlesser et al., 2006), competitive ecosystems or acidification, may not be useful in reduction of some STEC strains. Further research in this area should be conducted, particularly on non-O157 serogroups. Hygienic practices along the distribution chain and a continuous chill chain are essential in the control of STEC.

9.3. Combination of preventive practices

Combining hurdles to prevent contamination and possible growth of STEC is recommended (Callaway et al., 2009; Vosough Ahmadi et

al., 2007). The efficiency of a combination of hurdles at the farm level was studied by Ellis-Iversen et al. (2008). The statistical evidence showed that dry bedding and maintenance of animals in the same groups were the most important measures. Other authors have also attempted to model combined interventions of vaccination, diet, probiotics and water and bedding hygiene (Vosough Ahmadi et al., 2007; Wood et al., 2007).

9.4. Validation, monitoring, verification of control measures

Although there have been outbreaks associated with STEC in raw milk, the occurrence of STEC in raw milk is low (Baylis, 2009; and see Table 3 above). Therefore, end product microbiological analysis for STEC is unlikely to deliver meaningful reductions in associated risk for the consumer (Anonymous, 2003) and the routine monitoring for STEC would not significantly reduce the occurrence of associated cases. Microbiological criteria based on process hygiene, for example based on *E. coli* and/or Enterobacteriaceae, may prove a useful validation, monitoring and verification tool for control measures. A microbiological hygiene criterion based on *E. coli* counts is applied in the European Union for cheeses made from milk or whey that have undergone heat treatment (Anonymous, 2007b). A microbiological criterion is also used for butter and cream made from raw milk or milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation. This is based on counts of Enterobacteriaceae for milk or whey powder, for ice-cream and frozen dairy desserts, for dried infant formulae and dried dietary foods for special medical purposes intended for infants below 6 months of age, and for dried follow-on formulae.

The use of emerging metrics of microbiological risk management (Anonymous, 2007c), such as a performance objective (PO) could also be useful. A PO is the maximum frequency and/or concentration of a microbiological hazard in a food, at a particular point in the food chain, which should not be exceeded if one is to have confidence that the food safety objective or appropriate level of protection will be maintained. It is expressed in the same way as the microbiological limit of a microbiological criterion (MC) that is in CFU/g. But the PO is a target to be achieved, while the MC is a measurement result that is not equal to the PO, because it has to account for sampling and measurement errors. When the bacterial concentration is too low to be measured, the verification of the PO can only be performed by averaging the results of analyses done on samples analysed sequentially over time (Cerf, 2009). The control of STEC in dairy production can only be achieved by a set of measures along the entire food chain. The optimum combination of these measures remains to be determined and more research is needed to better evaluate the prevalence and numbers along the food chain and the efficacy of control measures, and to develop recognised methods for inexpensive and rapid analyses.

10. Conclusions

While severe cases of bloody diarrhoea or HUS caused by STEC are uncommon, they do affect mostly vulnerable groups such as young children and elderly people, although the outbreak in Germany (ECDC, 2011) in May/June 2011 has highlighted other vulnerable groups. As a result, STEC are perceived as a serious foodborne hazard of increasing concern to authorities and agencies charged with food safety. The most frequent STEC involved in human disease, *E. coli* O157:H7, is commonly known as the "hamburger bug", yet, sporadic cases and rare outbreaks caused by this and other STEC serogroups, are also due to ingestion of milk or milk products. This review therefore focused on the recent advances in understanding of STEC and their significance in milk and dairy products.

There are many difficulties in assessing occurrence of STEC. Available analytical methods only aim at detecting the serogroups or virulence markers, such as intimin, Shiga toxins, adhesins and

enterohemolysin associated with strains that caused outbreaks. Again, as seen in the German outbreak, recombination of bacterial DNA leading to new combinations of virulence genes in a new pathogenic type, can pose new challenges in this regard. While standard and validated methods are available and are recommended for use in detection and isolation of *E. coli* O157:H7 from food and animals, there are no standard protocols for their enumeration. For the other STEC serogroups, which are currently considered a potentially significant risk to human health, there are as yet no internationally accepted and validated methods for detection or enumeration. Pragmatic but still rather complicated approaches have been developed. The application of a combination of effective selective and differential plating media and molecular typing methods is needed for routine monitoring and collection of the quantitative data which are essential to better understand the associated human health risks. Availability of such knowledge would help to define more effective processing strategies to reduce contamination of raw food products.

According to EFSA (2007), there are a wide variety of STECs associated with food producing animal populations, for which public health importance remains unclear. Identification of potential virulence factors continues, but understanding of the interactions between virulence factors and host components remains incomplete. It is still not possible to fully define human pathogenic STECs and to know a priori if a given strain is a pathogenic STEC. This can only be done with certainty a posteriori, after isolation from a patient (AFSSA, 2010).

Consequently, only *potentially* pathogenic strains can be detected, leading to too high a number of warnings, or false alarms. If only *stx* genes are sought, the prevalence of *potentially* pathogenic STEC can appear high. Yet, when isolation of strains and serotyping is carried out, or when the presence of more than one gene is sought, the prevalence of *potentially* pathogenic strains in lactating animal faeces, in milk and in cheeses is most often low, around 1% or less. The possibility of a non-pathogenic strain acquiring pathogenic determinants (like *stx* genes) through recombination remains. As a consequence, a consensus is urgently needed on a scientific definition of pathogenic STECs and the optimal strategy to define the set of pathogenicity determinants that should be sought.

Once milk has been contaminated with STEC, they can subsequently grow in milk products produced from this contaminated milk, if an intervention strategy like pasteurisation is not used. For example, studies have shown that for artificially contaminated soft cheese, *E. coli* O157:H7 is capable of surviving the cheese manufacturing, ripening and storage processes. Many studies have documented the effects of various intervention techniques on *E. coli* O157:H7. Some of these interventions should also be tested on non-O157 serogroups, as it is known that variability among different serogroups is large with regard to growth and survival properties. Further studies are needed to understand the behaviour of STEC (other than O157:H7) in dairy products and understand the impact of matrices and processes on the expression of virulence factors.

At present, milk pasteurisation is generally advised. Regarding the use of raw milk for the production of cheese or other milk products, additional hygiene provisions should be used in the production of such milk (CAC, 2004). Further research is needed to determine the best combination of the available hurdles, viz. appropriate herd management practices, elimination of high-shedders, vaccination, diet and/or probiotics in feed that should be used. In addition, it is necessary to reduce the circulation of strains between farms, and to implement good hygienic practices on the farm. Particularly, not only during raw milk cheese processing, but also for pasteurised dairy products, strict hygiene is essential, and good manufacturing and hygiene practices as well as HACCP principles should be followed to prevent post-pasteurisation contamination. Safety of cheeses is enhanced when production includes a combination of adequate acid production and reduced a_w , such as that found in hard, aged cheeses.

With respect to the prevention of sporadic cases of disease caused by STEC, the question of the relevance of regular monitoring to control STEC in food arises. End-product testing for STEC is not an effective control strategy; therefore, it would be ineffective to set a microbiological criterion because contamination rates in suspect foods are very low. In addition, the presence of STEC is highly improbable so the chance of obtaining isolates from samples in a batch of food is small. The setting of a PO would be more likely to prove useful.

The International Dairy Federation is aware of the risk posed by the occurrence and possible growth of pathogenic strains of STEC in milk and dairy products. It is recognised that effective means for preventing milk contamination at the farm are limited and that pasteurisation ensures the safety of milk and milk products, for the most part. Interventions during raw milk processing are limited and strict hygiene practices at farm level need to be implemented in order to prevent contamination. The number of cases of severe disease caused by STEC in dairy products has remained quite low, probably thanks to the compliance with good hygienic practices at the farm level.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of the International Dairy Federation in preparation of this review.

References

- Adesiyun, A.A., Stoute, S., David, B., 2007. Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centers. *Food Control* 18, 312–320.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008, 27 mai 2010, pp. 1–19 (Afssa saisine no 2010-SA-0122, Maisons-Alfort, France. Available at <http://www.afssa.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>. Last accessed 17th October 2011).
- Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W., Karch, H., 2001. Infections à *Escherichia coli* O157 associées au lait non pasteurisé. *Eurosurveillance* 6 (article 379, 2001-10-01).
- Allerberger, F., Friedrich, A.W., Grif, K., Dierich, M.P., Dornbusch, H.J., Mache, C.J., Nachbaur, E., Freilinger, M., Rieck, P., Wagner, M., 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *International Journal of Infectious Diseases* 7, 42–45.
- Almeida, G., Figueiro, A., Rolá, M., Barros, R.M., Gibbs, P., Hogg, T., Teixeira, P., 2007. Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. *Journal of Food Protection* 70, 1710–1716.
- Ammon, A., 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance* 2, 91–95 (article 133, 1997-12-01).
- Anonymous, 1999. Outbreak of vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 infection in North Cumbria. *CDR Weekly* 9, 95–98 (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/1999/cdr1199.pdf>. Last accessed 17th October 2011).
- Anonymous, 2003. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in Foodstuffs. European Commission – Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.
- Anonymous, 2004. Code of good hygienic practices for milking with automatic milking systems. *Bulletin of the International Dairy Federation* 386, 43–49 (2004).
- Anonymous, 2007a. Good dairy farming practices related to primary production of milk and farm management. *Bulletin of the International Dairy Federation* 418, 3–42 (2007).
- Anonymous, 2007b. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L322, 12–29.
- Anonymous, 2007c. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management (MRM) – CAC/GL 63-2007. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- Anonymous, 2008. Guide to Good Animal Welfare in Dairy Production. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Ansary, S.E., Kaspar, C.W., 1997. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 25, 131–134.
- Arimi, S.M., Koroti, E., Kang'ethe, E.K., Omoro, A.O., McDermott, J.J., 2005. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Tropica* 96, 1–8.

- Asper, D.J., Sekirov, I., Finlay, B.B., Rogan, D., Potter, A.A., 2007. Cross reactivity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-specific sera with non-O157 serotypes. *Vaccine* 25, 8262–8269.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Tache, J., Leclerc, V., Deperrois, V., Lombard, B., 2007. Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Letters in Applied Microbiology* 45, 646–651.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Tache, J., Derzelle, S., 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Letters in Applied Microbiology* 48, 554–559.
- Avery, S.M., Moore, A., Hutchinson, M.L., 2004. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters in Applied Microbiology* 38, 355–359.
- Ballmer, K., Korczak, B.M., Kuhnert, P., Slickers, P., Ehrlich, R., Hachler, H., 2007. Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 370–379.
- Bastian, S.N., Sivelä, S.K., 2000. *Escherichia coli* O157:H7: aspects of concern to the dairy industry. *Bulletin of the International Dairy Federation* 357, 57–62 (2000).
- Bastian, S.N., Carle, I., Grimont, F., 1998. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 149, 457–472.
- Baylis, C.L., 2008. Growth of pure cultures of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1259–1265.
- Baylis, C.L., 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology* 62, 293–307.
- Becker, A.L., 2005. Alberta E. coli outbreak tied to milk shakes. *Press release CIDRAP*, 2005-05-13.
- Belanger, S.D., Boissinot, M., Menard, C., Picard, F.J., Bergeron, M.G., 2002. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1436–1440.
- Berry, E.D., Wells, J.E., 2010. *Escherichia coli* O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Advances in Food and Nutrition Research* 60, 67–117 (Chapter 4).
- Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., Griffin, P.M., 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association* 269, 2217–2220.
- Bettelheim, K.A., 2007. The non-O157 Shiga-toxicogenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*: under-rated pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* 33, 67–87.
- Betts, C.D., 2000. Controlling *E. coli* O157:H7. *Nutrition and Food Science* 30, 183–186.
- 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*. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2559–2564.
- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2483–2488.
- Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K., Albrecht, N., 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4769–4775.
- Beutin, L., Jahn, S., Fach, P., 2009. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1122–1132.
- Bielaszewska, M., Janda, J., Bláhová, K., Mínaríková, H., Jíková, E., Karmali, M.A., Laubová, J., Šikulo, J., Preston, M.A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarová, H., Nyc, O., 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiology and Infection* 119, 299–305.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., Karch, H., 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1160–1167.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H., 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 11, 671–676.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J.M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Dahbi, G., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1351–1356.
- Bockemuhl, J., Karch, H., 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994–1995). *Bundesgesundheitsblatt* 39, 290–296.
- Bockemühl, J., Karch, H., Rüssmann, H., Aleksic, S., Wiss, R., Emmrich, P., 1990. Shiga-like toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8: Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom. *Bundesgesundheitsblatt* 33, 3–6.
- Bonnet, R., Souweine, B., Gauthier, G., Rich, C., Livrelli, V., Siro, J., Joly, B., Forestier, C., 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1777–1780.
- Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Herman, L., 2003. Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs. *Research in Microbiology* 154, 97–104.
- Bretschneider, G., Berberov, E.M., Moxley, R.A., 2007. Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118, 229–238.
- Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., Karch, H., 1999. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145, 1005–1014.
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R., 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology* 193, 883–891.
- Bugarel, M., Beutin, L., Fach, P., 2010a. Low-density microarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): a new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 203–211.
- Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A., Fach, P., 2010b. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans. *International Journal of Food Microbiology* 142, 318–329.
- Buglino, D., Smith-Sayer, K., Fortino, S., Van Meter, J., Frykman, E., Crawford-Miksza, L., Myers, C., Himathongkham, S., Palumbo, M., Atwell, J., Chang, T., Csuti, D., Fontanoz, S., Gerbrecht, Y., Glover, J., O'Connell, J., Sun, B., Wheeler, C., Zhao, Y., Lynch, M., 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows – California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57, 625–628.
- Buens, G., Possé, B., De Schrijver, K., De Zutter, L., Lauwers, S., Pierard, D., 2011. Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related haemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 421–426.
- Byrne, C.M., Erol, I., Call, J.E., Kaspar, C.W., Buege, D.R., Hiemke, C.J., Fedorka-Cray, P.J., Benson, A.K., Wallace, F.M., Luchansky, J.B., 2003. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the Upper Midwest Region of the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4683–4688.
- CAC (Codex Alimentarius Commission), 2004. Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- Callaway, T.R., Anderson, R.C., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Harvey, R.B., Poole, T.L., Nisbet, D.J., 2004. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. *Animal Health Research Reviews* 5, 35–47.
- Callaway, T.R., Carr, M.A., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology* 11, 67–80.
- Caro, I., Garcia-Armesto, M.R., 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 116, 410–413.
- Caseneuve, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoît, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P., Grimont, P.A.D., 1993. Écllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 48, 222–224.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F., Foster, J.W., 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181, 3525–3535.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 1995a. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44, 157–160.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 1995b. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 – Helena, Montana, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44, 501–503.
- CDC (Centers for Diseases 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.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds—Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49, 911–913.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55, 1045–1046.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2007a. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk – Washington and Oregon, November–December 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 56, 165–167.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2007b. Foodborne Outbreak Online Database, 2007 July, Colorado, *E. coli* Shiga Toxin Producing O121, O26, O84, Prison Jail. American Cheese Pasteurized. (<http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Last accessed December 24th 2011).
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows – California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57, 625–628.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. (2010-11-24).
- CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre), 1998a. Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurized cream in England. *Eurosurveillance* 2, 1135 (1998-10-29).

- CDC (Communicable Disease Surveillance Centre), 1998b. Outbreak of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection in Dorset. CDR Weekly: Communicable Disease Report 8 (183), 186.
- Cerf, O., 2009. Modern Concepts of Microbiological Risk Management, from a "Hazard Focused" to a "Risk Focused" Approach. IDF World Dairy Summit "United Dairy World". (Berlin, Germany, 20–24 September 2009).
- Chao, G., Zhou, X., Jiao, X., Qian, X., Xu, L., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 277–284.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., Woolhouse, M., 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology* 6, 904–912.
- Civera, T., Decastelli, L., Martorana, M., Dalmasso, A., Nucera, D., Bottero, M.T., 2007. Survey on the presence of enterovirulent *Escherichia coli*, including *E. coli* O157, in cheese manufactured in the Italian Alpine Region. *International Journal of Food Science* 19, 229–238.
- Čížek, A., Dolejšká, M., Novotná, R., Haas, D., Vyskočil, M., 2008. Survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology* 104, 852–860.
- Clark, A., Morton, S., Wright, P., Corkish, J., Bolton, F.J., Russell, J., 1997. A community outbreak of vero-cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection linked to a small farm dairy. *Communicable Disease Report. CDR Review* 7, R206–R211.
- Clough, H.E., Clancy, D., French, N.P., 2009. Quantifying exposure to vero-cytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in milk sold as pasteurized: a model-based approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 95–105.
- Cobbaut, K., Berkvens, D., Houf, K., De Deken, R., De Zutter, L., 2009. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. *Journal of Food Protection* 72, 1848–1853.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2001. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 79, 323–335.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4148–4152.
- Cobbold, R.N., Davis, M.A., Rice, D.H., Szymanski, M., Tarr, P.I., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2008. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *Journal of Food Protection* 71, 1023–1027.
- Cody, S., Glynn, M., Farrar, J., Cairns, K., Griffin, P., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A., Lewis, J., Swaminathan, B., Bryant, R., Vugia, D., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine* 130, 202–209.
- Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J., Hanson, M.F., 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk acid raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology* 66, 63–69.
- Collins, J.D., Wall, P.G., 2004. Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. *Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties*, 23, pp. 685–700.
- Conedera, G., Dalvit, P., Martini, M., Galiero, G., Gramaglia, M., Goffredo, E., Loffredo, G., Morabito, S., Ottaviani, D., Paterlini, F., Pezzotti, G., Pisanu, M., Semprini, P., Caprioli, A., 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 67–73.
- Cookson, A.L., Cooley, W.A., Woodward, M.J., 2002. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Medical Microbiology* 292, 195–205.
- Cookson, A.L., Taylor, S.C.S., Bennett, J., Thomson-Carter, F., Attwood, G.T., 2006. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 54, 78–84.
- Cornick, N.A., Helgerson, A.F., Mai, V., Ritchie, J.M., Acheson, D.W., 2006. In vivo transduction of an *Stx*-encoding phage in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5086–5088.
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhahi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Orden, J.A., 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology* 110, 67–76.
- Curnow, J., 1999. *Escherichia coli* O157 outbreak in Scotland linked to unpasteurised goat's milk. *Eurosurveillance* 3 (article 1387).
- D'Amico, D.J., Groves, E., Donnelly, C.W., 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection* 71, 1580–1589.
- D'Amico, D.J., Druart, M.J., Donnelly, C.W., 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *Journal of Food Protection* 73, 2217–2224.
- D'Aoust, J.Y., Park, C.E., Szabo, R.A., Todd, E.C.D., 1988. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 71, 3226–3230.
- De Lamo-Castellví, S., Capellas, M., Roig-Sagués, A.X., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M.M., Guamis, B., 2006. Fate of *Escherichia coli* strains inoculated in model cheese elaborated with or without starter and treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection* 69, 2856–2864.
- De Reu, K., Debeuckelaere, W., Botteldoorn, N., De Block, J., Herman, L., 2002. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety* 22, 183–196.
- De Reu, K., Grijspeerd, K., Herman, L., 2004. A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety* 24, 17–36.
- De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, C., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D., Dierick, K., Van Damme-Lombaerts, R., Lauwers, C., Jakobs, R., 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance* 13 (article 8041, 2008-02-14).
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology* 138, 571–578.
- Dean, P., Kenny, B., 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology* 12, 101–109.
- Deudt, B., 1995. Cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques dans le département de l'Ardèche en 1994. Institut de Veille Sanitaire, France.
- Delignette-Muller, M.-L., Cornu, M., the AFSSA STEC Study Group, 2008. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *International Journal of Food Microbiology* 128, 158–164.
- Derzelle, S., Grine, A., Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Dilasser, F., Jamet, E., Auvray, F., 2011. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in minced beef and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 151, 44–51.
- Deschênes, G., Casenave, C., Grimont, F., Desenclos, J.C., Benoit, S., Collin, M., Baron, S., Mariani, P., Grimont, P.A., Nivet, H., 1996. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatric Nephrology* 10, 203–205.
- Dewanti, R., Wong, A.C.L., 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 26, 147–164.
- Dineen, S.S., Takeuchi, K., Soudah, J.E., Boor, K.J., 1998. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *Journal of Food Protection* 61, 1602–1608.
- Dinu, L.-D., Bach, S., 2011. Induction of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 on the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8295–8302.
- Djuretic, T., Wall, P.G., Nichols, G., 1997. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Communicable Disease Report CDR Rev.*, 7, pp. R41–R45.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A., Levidiotou, S., 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 82, 273–279.
- Doyle, M.P., Schoeni, J.L., 1984. Survival and growth-characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 855–856.
- Dziva, F., Vlisidou, I., Crepin, V.F., Wallis, T.S., Frankel, G., Stevens, M.P., 2007. Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Veterinary Microbiology* 123, 254–261.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Shiga Toxin/Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Humans, Food and Animals in the EU/EEA, with Special Reference to the German Outbreak Strain STEC O104. ECDC, Stockholm.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC. *The EFSA Journal* 579, 1–61.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2009a. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food) on request of EFSA. *The EFSA Journal* 7, 1366.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2009b. The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 271.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* 8, 1496.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: taking stock. *The EFSA Journal* 9, 2390.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* 3 (2090), 1–378.
- Ellis-Iversen, J., Smith, R.P., Van Winden, S., Paiba, G.A., Watson, E., Snow, L.C., Cook, A.J.C., 2008. Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle—a randomised controlled trial. *Veterinary Research* 39, 1–12.
- Eppinger, M., Mammel, M.K., LeClerc, J.E., Ravel, J., Cebula, T.A., 2011. Genome signatures of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from the bovine host reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2916–2925.
- Ercolini, D., Fusco, V., Blaiotta, G., Sarghini, F., Coppola, S., 2005. Response of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* to the thermal stress occurring in model manufactures of grana padano cheese. *Journal of Dairy Science* 88, 3818–3825.
- Erickson, M.C., Doyle, M.P., 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 70, 2426–2449.
- Erlisson, E., Aspan, A., Gunnarsson, A., Vagsholm, I., 2005. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiology and Infection* 133, 349–358.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernoy-Rozand, C., 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection* 134, 143–146.

- Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T., Mølbak, K., 2007. An outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Eurosurveillance* 12 (article 3208, 2007-05-31).
- Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T., Nielsen, E., Mølbak, K., 2009. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clinical Infectious Diseases* 48, e78–e81.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Groux, J., 2001. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *Journal of Applied Microbiology* 90, 809–818.
- Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansary, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B., Kaspar, C.W., 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1519–1525.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2011. *Food Outlook, Global Market Analysis*, pp. 43–44 (<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>). Last accessed 17th October 2011.
- Fedio, W.M., Jinneman, K.C., Yoshitomi, K.J., Zapata, R., Wendakoon, C.N., Browning, P., Weagant, S.D., 2011. Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods. *International Journal of Food Microbiology* 148, 87–92.
- Feng, P., Weagant, S.D., Monday, S.R., 2001. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 24–28.
- Food Poison Journal, 2009-12-02, presented by Marler Clark. <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/raw-milk-e-coli-strikes-again-recent-illnesses-are-reminder-of-risks-from-drinking-raw-milk/>. Last accessed 19th April 2012.
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, A., Stradiotto, K., 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *The Journal of Dairy Research* 69, 213–225.
- Foster, J.W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2, 898–907.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2004. Cheese: an overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry: Physics and Microbiology*, 1. Elsevier Academic Press, London, pp. 1–18.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Miyamoto, T., Liu, Y., 2009. PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 605–611.
- Fratamico, P.M., Bagi, L.K., Cray, W.C., Narang, N., Yan, X., Medina, M., Liu, Y., 2011. Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 601–607.
- Frémaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., Vernozy-Rozand, C., 2006. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Veterinary Microbiology* 117, 180–191.
- Frémaux, B., Delignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A., Vernozy-Rozand, C., 2007a. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *Journal of Applied Microbiology* 102, 89–99.
- Frémaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Dothal, M., Vernozy-Rozand, C., 2007b. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Letters in Applied Microbiology* 45, 55–61.
- Frémaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Mallen, B., Dothal, M., Gleizal, A., Vernozy-Rozand, C., 2008a. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *Journal of Applied Microbiology* 104, 296–304.
- Frémaux, B., Prigent-Combaret, C., Vernozy-Rozand, C., 2008b. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Veterinary Microbiology* 25, 1–18.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., Karch, H., 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases* 185, 74–84.
- Galland, J.C., Hyatt, D.R., Crupper, S.S., Acheson, D.W., 2001. Prevalence, antibiotic susceptibility and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1619–1627.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51–70.
- Garber, L.P., Wells, S., Schroeder-Tucker, L., Ferris, K., 1999. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *Journal of Food Protection* 62, 307–312.
- Garmendia, J., Frankel, G., Crepin, V.F., 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity* 73, 2573–2585.
- Geue, L., Klare, S., Schnick, C., Mintel, B., Meyer, K., Conraths, F.J., 2009. Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6947–6953.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., Doyle, M.P., 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2513–2516.
- Govaris, A., Koidis, P., Papatheodorou, K., 2001. The behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in whey cheeses Myzithra, Anthotyros and Manouri during storage at 2 °C and 12 °C. *Food Microbiology* 18, 565–570.
- Govaris, A., Papageorgiou, D.K., Papatheodorou, K., 2002. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses. *Journal of Food Protection* 65, 609–615.
- Grace, D., Omoro, A., Randolph, T., Kang'ethe, E., Nasinyama, G., Mohammed, H., 2008. Risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in marketed unpasteurized milk in selected East African countries. *Journal of Food Protection* 71, 257–263.
- Grzadkowska, D., Griffiths, M.W., 2001. Cryotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media and food. *Journal of Food Science* 66, 1169–1173.
- Gyles, C., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science* 85, E45–E62.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Herriot, D.E., Tarr, P.I., 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology and Infection* 118, 193–195.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., Rice, D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology* 66, 71–78.
- Hanna, S.S., Atkinson, R.M., Jones, T.F., Dunn, J.R., 2010. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Tennessee: surveillance and current clinical laboratory practices. *Tennessee Medicine* 103, 39–42.
- Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Kumagai, S., 2000. *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Letters in Applied Microbiology* 30, 151–154.
- Hazarika, R.A., Singh, D.K., Kapoor, K.N., Bhilegaonkar, K.N., Agarwal, R.K., Malik, S.V.S., 2003. Survivability of vero toxic *Escherichia coli* O111 against sodium benzoate and potassium sorbate added to simulating media for beef gravy. *Journal of Veterinary Public Health* 1, 103–112.
- Herold, S., Karch, H., Schmidt, H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages—genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 115–121.
- Heuvelink, A.E., Van den Beggelaar, F.L., Zwartkuis-Nahuis, J., Herbes, R.G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W.J., Monnens, L.A., de Boer, E., 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3480–3487.
- Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkowski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., Slutsker, L., 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine* 159, 1758–1764.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., Miyazaki, Y., 2002. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 922–925.
- Honish, L., Pardy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska-Grochowska, K., Trottier, L., Kreplin, C., Zazulak, I., 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Revue canadienne de Santé publique*, 96, pp. 182–184.
- Hudson, L.M., Chen, J., Hill, A.R., Griffiths, M.W., 1997. Bioluminescence: a rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and cheese varieties. *Journal of Food Protection* 60, 891–897.
- Hussein, H., Bollinger, L., 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *Journal of Food Protection* 68, 2224–2241.
- Hussein, H., Sakuma, T., 2005a. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science* 88, 450–465.
- Hussein, H., Sakuma, T., 2005b. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. *Journal of Food Protection* 68 (1), 199–207 (2005).
- ICSMF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. *Micro-organisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London; New York.
- Imberechts, H., Pierard, D., Vanholme, L., Vereecken, K., 2007. Report on Zoonotic Agents in Belgium in 2007, pp. 41–44 (http://www.favv.be/publications-en/_documents/2006_Report-on-zoonotic-agents_en.pdf). Last accessed January 3rd 2012.
- INVS (Institut de Veille Sanitaire), 2004. Investigation autour de deux cas de SHU à *E. coli* O157 dans les Vosges. (June 2004).
- INVS (Institut de Veille Sanitaire), 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, nord-ouest de la France, octobre-décembre 2005. Available at http://www.invs.sante.fr/publications/2008/epidemie_e_coli_camembert/rapport_epidemie_stec.pdf. Last accessed 21st August 2012.
- ISO, 2001. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of Escherichia coli O157*. (BS EN ISO 16654).
- Ito, K., Iida, M., Yamazaki, M., Moriya, K., Muroishi, S., Yatsuyanagi, J., Kurazono, T., Hiruta, N., Ratchtrachenchai, O.A., 2007. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1038–1041.
- Jacob, M.E., Callaway, T.R., Nagaraja, T.G., 2009. Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 785–792.
- Jasson, V., Rajkovic, A., Baert, L., Debevere, J., Uyttendaele, M., 2009. Comparison of enrichment conditions for rapid detection of low numbers of sublethally injured *Escherichia coli* O157 in food. *Journal of Food Protection* 72, 1862–1868.
- Jayaroo, B.M., Henning, D.R., 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 84, 2157–2162.
- Jayaroo, B.M., Donaldson, S.C., Straley, B.A., Sawant, A.A., Hegde, N.V., Brown, J.L., 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science* 89, 2451–2458.
- Jenkins, C., Pearce, M.C., Smith, A.W., Knight, H.I., Shaw, D.J., Cheasty, T., Foster, G., Gunn, G.J., Dougan, G., Smith, H.R., Frankel, G., 2003. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Letters in Applied Microbiology* 37, 207–212.

- Jensen, C., Ethelberg, S., Gervelmeyer, A., Nielsen, E.M., Olsen, K.E., Mølbak, K., 2006. First general outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Eurosurveillance* 11 (article 597, 2006-02-01).
- Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L., 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1587–1595.
- Jordan, K.N., Maher, M.M., 2006. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 by conventional plating techniques. *Journal of Food Protection* 69, 689–692.
- Jordan, K.N., Oxford, L., O'Byrne, C.P., 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3048–3055.
- Judge, N.A., Mason, H.S., O'Brien, A.D., 2004. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infection and Immunity* 72, 168–175.
- Kangethe, E.K., Onono, J.O., McDermott, B., Arimi, M., 2007. Isolation of *E. coli* O157:H7 from milk and cattle faeces from urban dairy farming and non dairy farming neighbour households in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya: prevalence and risk factors. *East African Medical Journal* 84, S65–S75.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123–140.
- Karch, H., Bielaszewska, M., 2001. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2043–2049.
- Karch, H., Meyer, T., 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2751–2757.
- Karch, H., Tarr, P.I., Bielaszewska, M., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 405–418.
- Karmali, M., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, R., Rahm, K., Kaper, J., 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4930–4940.
- Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* 140, 360–370.
- Karns, J.S., Van Kessel, J.S., McClusky, B.J., Perdue, M.L., 2007. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science* 90, 3212–3219.
- Kaspar, C.W., Doyle, M.E., 2009. White Paper on Non-O157:H7 Shiga-toxin Producing *E. coli* from Meat and Non-meat Sources. American Meat Institute Foundation.
- Kauppi, K.L., Tattini, S.R., Harrell, F., Feng, P., 1996. Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 13, 397–405.
- Kaur, J., Ledward, D.A., Park, R.W., Robson, R.L., 1998. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 26, 325–330.
- Keene, W.E., Hedberg, K., Herriott, D.E., Hancock, D.D., McKay, R.W., Barrett, T.J., Fleming, D.W., 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *Journal of Infectious Diseases* 176, 815–818.
- Khanna, R., Waechter, L., Sargeant, J., Clark, W.F., Garg, A.X., 2008. Environmental prevention of human disease from verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 23, 1819–1822.
- King, T., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., Gobius, K., 2010. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6514–6528.
- Konczyk, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A.M., Whittam, T.S., Wickham, M., Finlay, B., Karmali, M.A., 2008. Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190, 5832–5840.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18, 775–779.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21, 805–815.
- Kudva, I., Hatfield, P.G., Hovde, C.J., 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 431–433.
- Kudva, I., Hatfield, P.G., Hovde, C.J., 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 892–899.
- La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Wales, A.D., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 394–410.
- Lahti, E., Eklund, M., Ruuru, P., Siitonen, A., Rantala, L., Nuorti, P., Honkanen-Buzalski, T., 2002. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 189–195.
- Lahti, E., Ruoho, O., Rantala, L., Hänninen, M.L., Honkanen-Buzalski, T., 2003. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 554–561.
- Laing, C.R., Buchanan, C., Taboada, E.N., Zhang, Y., Karmali, M.A., Thomas, J.E., Gamon, V.P., 2009. In silico genomic analyses reveal three distinct lineages of *Escherichia coli* O157:H7, one of which is associated with hyper-virulence. *BMC Genomics* 10, 287.
- Leistner, L., 1995. Principles and applications of hurdle technology. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 1–21.
- Lejeune, J.T., Wetzel, A.N., 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Journal of Animal Science* 85, 73–80.
- Lejeune, J.T., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3053–3057.
- Lejeune, J.T., Besser, T.E., Rice, D.H., Berg, J.L., Stilborn, R.P., Hancock, D.D., 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 377–384.
- Lejeune, J.T., Hancock, D., Wasteson, Y., Skjerve, E., Urdahl, A.M., 2006. Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (stx) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *International Journal of Food Microbiology* 109, 19–24.
- Liebana, E., Smith, R.P., Batchelor, M., McLaren, I., Cassar, C., Clifton-Hadley, F.A., Paiba, G.A., 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 898–902.
- Lin, A., Sultan, O., Lau, H.K., Wong, E., Hartman, G., Lauzon, C.R., 2011. O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiology* 28, 478–483.
- Lindblad, M., Lindqvist, R., 2010. Modelling time to growth of *Escherichia coli* as a function of water activity and undissociated lactic acid. *Letters in Applied Microbiology* 50, 308–313.
- Line, J.E., Fain Jr, A.R., Moran, A.B., Martin, L.M., Lechowich, R.V., Carosella, J.M., Brown, W.L., 1991. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and Z-value determinations in ground beef. *Journal of Food Protection* 54, 762–766.
- Liptakova, A., Siegfried, L., Rosocha, J., Podracka, I., Bogiova, E., Kotulova, D., 2004. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurized cow's milk in Slovakia. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 576–578.
- Lira, W.M., Macedo, C., Marin, J.M., 2004. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 97, 831–866.
- Loneragan, G.H., Brashears, M.M., 2005. Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. *Meat Science* 71, 72–78.
- Lorusso, V., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., La Salandra, G., Lucifora, G., Mula, G., Virgilio, S., Carosielli, L., Rella, A., Dario, M., Normanno, G., 2009. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26 in raw water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk products in Italy. *Journal of Food Protection* 72, 1705–1708.
- Lynch, M.J., O'Connor, L., Fox, E.M., Jordan, K., Murphy, M., 2012. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O111, O26, O103, O145 in Irish dairy cattle and raw milk: prevalence and epidemiology of emergent strains. *Zoonoses and Public Health* 59, 264–271. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01443.x>.
- Madic, J., Lecureuil, C., Dilasser, F., Derzelle, S., Jamet, E., Fach, P., Auvray, F., 2009. Screening of food raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Letters in Applied Microbiology* 48, 447–451.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., Auvray, F., 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1696–1705.
- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Schuetz, F., Brugere, H., Jamet, E., Auvray, F., 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2035–2041.
- Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. *TEC&DOC* ed. Paris.
- Maher, M.M., Jordan, K.N., Upton, M.E., Coffey, A., 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Journal of Applied Microbiology* 90, 201–207.
- Manna, S.K., Manna, C., Batabyal, K., Das, B., Golder, D., Chattopadhyay, S., Biswas, B.K., 2010. Serogroup distribution and virulence characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* from food and cattle stool. *Journal of Applied Microbiology* 108, 658–665.
- Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., Whittam, T.S., 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4868–4873.
- MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec), 2004. Mise en garde - Onze personnes malades à la suite de la consommation de fromages au lait cru fabriqués à la ferme. *Press Release*, 2004-07-14.
- March, S.B., Ratnam, S., 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 869–872.
- Marler, B., 2009. 2008 Raw Goat Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Linked to Dairy and Retail. *Marler Blog* (2009-12-16, <http://www.marlerblog.com/legal-cases/2008-raw-goat-milk-e-coli-o157h7-outbreak-linked-to-dairy-and-retail/>). Last accessed 23 April 2012).
- Marler, B., 2010. Raw Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Strikes Minnesota, Seventh Outbreak in 2010. *Marler Blog* (2010-05-28, <http://www.marlerblog.com/legal-cases/raw-milk-e-coli-o157h7-outbreak-strikes-minnesota-seventh-outbreak-in-2010/>). Last accessed 23 April 2012).
- Marouani-Gadri, N., Augier, G., Carpentier, B., 2009. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection – influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 133, 62–67.
- Márquez, J.G., García, C.E.R., 2007. Pathogenic microflora found in white "telita" cheese made in four states of Venezuela. *Anales Venezolanas de Nutrición* 20, 17–21.

- Martin, M.L., Shipman, L.D., Wells, J.G., Potter, M.E., Hedberg, K., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Arnold, J., Tilleli, J., 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uremic syndrome. *The Lancet* 328, 1043.
- Martucciello, A., Astarita, S., Ruggia, A., Alfano, D., Morena, C., Galiero, G., 2008. A survey on *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* O157 presence in Campania buffalo mozzarella cheese by real-time PCR. *Industrie Alimentari* 47, 1–2.
- Mathusa, E.C., Chen, Y., Enache, E., Hontz, L., 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of Food Protection* 73, 1721–1736.
- Matthews, K.R., Mordough, P.A., Bramley, A.J., 1997. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 82, 197–203.
- Matthews, L., Low, J.C., Gally, D.L., Pearce, M.C., Mellor, D.J., Heesterbeek, J.A., Chase-Topping, M., Naylor, S.W., Shaw, D.J., Reid, S.W., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., 2006. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 547–552.
- McGee, P., Scott, L., Sheridan, J.J., Earley, B., Leonard, N., 2004. Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. *Journal of Food Protection* 12, 2651–2656.
- McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B., Preston, T., 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canadian Communicable Disease Report* 28, 6–8.
- McKee, R., Madden, R.H., Gilmour, A., 2003. The occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments. *Journal of Food Protection* 66, 1576–1580.
- McNeilly, T.N., Naylor, S.W., Mahajan, A., Mitchell, M.C., McAteer, S., Deane, D., Smith, D.G.E., Low, J.C., Gally, D.L., Huntley, J.F., 2008. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infection and Immunity* 76, 2594–2602.
- McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J.C., Smith, D.G., Huntley, J.F., Mahajan, A., Gally, D.L., 2010. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA, and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine* 28, 1422–1428.
- McWilliam Leitch, E.C., Stewart, C.S., 2002a. Susceptibility of *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates to lactate. *Letters in Applied Microbiology* 35, 176–180.
- McWilliam Leitch, E.C., Stewart, C.S., 2002b. *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to L-lactate than to D-lactate. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4676–4678.
- Meals, D.W., Braun, D.C., 2006. Demonstration of methods to reduce *E. coli* runoff from dairy manure application sites. *Journal of Environmental Quality* 35, 1088–1100.
- Mechie, S.C., Chapman, P.A., Siddons, C.A., 1997. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiology and Infection* 118, 17–25.
- Mellmann, A., Harnsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y.M., Zhang, W.L., McLaughlin, S.F., Stephen, F., Henkhaus, J.K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H., 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6 (Article Number: e22751).
- Meng, J., Doyle, M.P., Zhao, T., Zhao, S., 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*, 3rd edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 249–269.
- Messelh usser, U., Beck, H., Gallien, P., Schalch, B., Busch, U., 2008. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. in cattle, food and water sources on Alpine pastures in Bavaria. *Archiv f ur Lebensmittelhygiene* 59, 103–106.
- Meyer-Brosseta, S., Bastian, S.N., Am e, P.D., Cerf, O., Sanaa, M., 2001. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 347–361.
- Miko, A., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Lobersli, I., Beutin, L., 2010. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiology Letters* 303, 137–146.
- Millet, L., Saubusse, M., Didienn e, R., Tessier, L., Montel, M.C., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 108, 105–114.
- Minnesota Department of Health, 2010. Three more *E. coli* cases linked to raw milk from farm. News release, 2010-06-11, <http://www.health.state.mn.us/news/pressrel/2010/ecoli061110.html>. Last accessed 23rd April 2012.
- Monday, S.R., Beisaw, A., Feng, P.C., 2007. Identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes* 21, 308–311.
- Montet, M., Jamet, E., Ganet, S., Dizin, M., Miszczycha, S., Duni ere, L., Thevenot, D., Vemozy-Rozand, C., 2009. Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *International Journal of Microbiology* 653481, 1–10 (article ID).
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., 2004. Phages types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4007–4015.
- Mora, A., Leon, S.L., Blanco, M., Blanco, J.E., Lopez, C., Dahbi, G., Echeita, A., Gonzalez, E.A., Blanco, J., 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *International Journal of Food Microbiology* 114, 204–210.
- Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Waiker, A.M., Rowe, B., Majid, F., 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection* 111, 181–187.
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.-P., Perrin, G., 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* 64, 217–221.
- Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E., Stephan, R., 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science* 86, 3849–3856.
- Murano, E.A., Pierson, M.D., 1992. Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 55, 171–175.
- Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Ivey, S.J., Gillespie, B.E., Almeida, R.A., Draughon, F.A., Oliver, S.P., 2002. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cow cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *Journal of Food Protection* 65, 752–759.
- Murphy, M., Buckley, J.F., Whyte, P., Mahony, M.O., Anderson, W., Wall, P.G., Fanning, S., 2007. Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *Zoonoses and Public Health* 54, 358–365.
- Nadala, C., Samadpour, M., 2011. Development of a non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* lateral flow device. *International Association of Food Protection Annual Meeting*, Milwaukee, USA, pp. P3–P11.
- Nastasicjevic, I., Mitrovic, R., Buncic, S., 2008. Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology* 46, 126–131.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 142–201.
- Naylor, S.W., Flockhart, A., Nart, P., Smith, D.G., Huntley, J., Gally, D.L., Low, J.C., 2007. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3765–3767.
- Nielsen, E.M., Andersen, M.T., 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2884–2893.
- Nielsen, E.M., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Jespersen, J.B., Baggesen, D.L., 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6944–6947.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Pacheco, A.G., Boxrud, D.J., Harrison, L.H., 2003. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5389–5397.
- Nooitgedagt, A.J., Hartog, B.J., 1988. A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 42, 57–72.
- O'Hanlon, K.A., Catarame, T.M., Duffy, G., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2004. RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1013–1023.
- Oksuz, O., Arid, M., Kurultay, S., Gumus, T., 2004. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control* 15, 453–456.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Cid, D., Gonzalez, E.A., Blanco, J., De La Fuente, R., 2003. Prevalence and characterization of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiology and Infection* 130, 313–321.
- Orden, J.A., Cortes, C., Horcajo, P., De la Fuente, R., Blanco, J.E., Mora, A., Lopez, C., Blanco, J., Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, J.C., Dominguez-Bernal, G., 2008. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Veterinary Microbiology* 132, 428–434.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity* 68, 64–71.
- Papageorgiou, D.K., Marth, E.H., 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. *Journal of Food Protection* 52, 459–465.
- Parisi, A., Miccolupo, A., Santagada, G., Pedarra, C., Dambrosio, A., Normanno, G., 2010. Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in minced beef and raw milk by colony hybridization. *Food Control* 21, 770–773.
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 598–602.
- Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A., Paton, J.C., 1999. Molecular characterization of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3357–3361.
- Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J., Stephan, R., 2011. An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *Journal of Food Protection* 74, 849–864.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157: H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* 18, 185–192.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2007. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International Journal of Food Microbiology* 113, 284–288.
- Persson, S., Olsen, K.E., Ethelberg, S., Scheutz, F., 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2020–2024.

- Peterson, R.E., Klopfenstein, T.J., Moxley, R.A., Erickson, G.E., Hinkley, S., Bretschneider, G., Berberov, E.M., Rogan, D., Smith, D.R., 2007a. Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. *Journal of Food Protection* 70, 2568–2577.
- Peterson, R.E., Klopfenstein, T.J., Moxley, R.A., Erickson, G.E., Hinkley, S., Rogan, D., Smith, D.R., 2007b. Efficacy of dose regimen and observation of herd immunity from a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for feedlot cattle. *Journal of Food Protection* 70, 2561–2567.
- Picozzi, C., Foschino, R., Heuvelink, A., Beumer, R., 2005. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Letters in Applied Microbiology* 40, 491–496.
- Pontello, M., Bersani, C., Colmegna, S., Cantoni, C., Mammìna, C., Rizzi, M., Barri, A., Nozza, L., 2003. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in foodstuffs of animal origin. *European Journal of Epidemiology* 18, 157–160.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L., 2008a. Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiology Letters* 282, 124–131.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L., 2008b. Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. *Journal of Applied Microbiology* 105, 227–235.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Siro, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1023–1031.
- Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C., Livrelli, V., 2008. Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2118–2128.
- Rahn, K., Renwick, S.A., Johnson, R.P., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Alves, D., McEwen, S., Lior, H., Spika, J., 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology and Infection* 119, 251–259.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W., 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 81, 1810–1817.
- Raynal-Ijutovac, K., Barral, J., Poutrel, B., Guillet, I., Boivin, J., Gaborit, P., Dirberg, R., De Crémoux, R., 2006. Recherche d'écosystèmes microbiens inhibiteurs de la croissance de *S. aureus* dans le lait de chèvre. 13èmes Rencontres Recherche Ruminants, pp. 415–418.
- Raynal-Ijutovac, K., Barral, J., Gaborit, P., Guillet, I., Boivin, J., Dirberg, R., De Crémoux, R., Beuvier, E., Poutrel, B., 2008. Inhibition naturelle de la croissance de *S. aureus* dans les fromages au lait cru de chèvre. 15èmes Rencontres Recherche Ruminants, p. 115.
- Raynaud, S., Vernoy-Rozand, C., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., Poutrel, B., Heuchel, V., Chatelin, Y.M., 2005. Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins Français. 12èmes Rencontres Recherche Ruminants, pp. 379–382.
- Raynaud, S., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., Poutrel, B., Heuchel, V., Chaltelain, Y.M., Vernoy-Rozand, C., 2006. Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. *Bulletin Épidémiologique* 21, 1–3.
- Reischl, U., Youssef, M.T., Kilwinski, J., Lehn, N., Zhang, W.L., Karch, H., Strockbine, N.A., 2002. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2555–2565.
- Reitsma, C.J., Henning, D.R., 1996. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 59, 460–464.
- Rey, J., Sanche, S., Blanco, J.E., De Mendoza, J.H., De Mendoza, M.H., Garcia, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M., 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 107, 212–217.
- RKI (Robert Koch Institut), 2008. Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epidemiologisches Bulletin* 11, 16–18.
- Rodriguez, E., Arques, J.A., Nunez, M., Gaya, P., Medina, M., 2005. Combined effect of high pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria on inactivation of in raw milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3399–3404.
- Rohde, H., Qin, J., Cui, Y., Li, D., Loman, N.J., Hentschke, M., Chen, W., Pu, F., Peng, Y., Li, J., et al., 2011. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *The New England Journal of Medicine* 365, 718–724.
- Roldán, M.L., Chinen, I., Otero, J.L., Miliwebsky, E.S., Alfaro, N., Burns, P., Rivas, M., 2007. Isolation, characterization and typing of *Escherichia coli* O157:H7 strains from beef products and milk. *Revista Argentina de Microbiología* 39, 113–119.
- Roopnarine, R.R., Ammons, D., Rampersad, J., Adesiyun, A.A., 2007. Occurrence and characterization of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) strains from dairy farms in Trinidad. *Zoonoses and Public Health* 54, 78–85.
- Rostagno, M.H., 2009. Can stress in farm animals increase food safety risk? *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 767–776.
- Rothschild, M., 2010. Sally Jackson cheese confirmed as outbreak source. *Food Safety News* 12–21. http://beforeitsnews.com/story/319/970/Sally-Jackson-Cheese_Confirmed_as_Outbreak_Source.html. Last accessed 17th October 2011.
- Rowe, M.T., Kirk, R., 1999. An investigation into the phenomenon of cross-protection in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 16, 157–164.
- Rozema, E.A., Stephens, T.P., Bach, S.J., Okine, E.K., Johnson, R.P., Stanford, K., McAllister, T.A., 2009. Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection* 72, 241–250.
- Rump, L.V., Strain, E.A., Cao, G., Allard, M.W., Fischer, M., Brown, E.W., Gonzalez-Escalona, N., 2011. Draft genome sequences of six *Escherichia coli* isolates from the stepwise model of emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology* 193, 2058–2059.
- Ryser, E.T., Marth, E.H., 1987a. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50, 372–378.
- Ryser, E.T., Marth, E.H., 1987b. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50, 7–13.
- Ryu, J., Beuchat, L., 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* 45, 185–193.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 1999. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. *Food Microbiology* 16, 317–324.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 247–254.
- Ryu, J.H., Kim, H., Frank, J.F., Beuchat, L.R., 2004. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Letters in Applied Microbiology* 39, 359–362.
- Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., 2000. Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology* 61, 159–167.
- Sargeant, J.M., Amezcua, M.R., Rajic, A., Waddell, L., 2007. Pre-harvest interventions to reduce the shedding of *E. coli* O157 in the faeces of domestic ruminants: a systematic review. *Zoonoses and Public Health* 54, 260–277.
- Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Löfdahl, S., Osterman, B., Ståhl, A., Eriksson, E., Hansson, H., Karpman, D., 2008. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage: aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection* 136, 370–380.
- Scheutz, F., Strockbine, N.A., 2005. *Escherichia*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, NY, pp. 607–624.
- Scheutz, F., Møller Nielsen, E., Frimodt-Møller, F., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J.P., Caprioli, A., 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uremic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance* 16 (article 19889).
- Schlesser, J.E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J., Teo, A.Y.L., 2006. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of Cheddar cheese made from unpasteurized milk. *Journal of Food Protection* 69, 990–998.
- Schmidt, F., 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology* 152, 687–695.
- Schouten, J.M., Graat, E.A.M., Frankena, K., van de Giessen, A.W., van der Zwaluw, W.K., de Jong, M.C.M., 2005. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. *Veterinary Microbiology* 107, 193–204.
- Sehgal, R., Kumar, Y., Kumar, S., 2008. Prevalence and geographical distribution of *Escherichia coli* O157 in India: a 10-year survey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, 380–383.
- Semanckek, J.J., Golden, D.A., 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during fermentation of apple cider. *Journal of Food Protection* 59, 1256–1259.
- Semanckek, J.J., Golden, D.A., 1998. Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid, and freezing. *Journal of Food Protection* 61, 395–401.
- Sharma, M., Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 99, 449–459.
- Shere, J.A., Bartlett, K.J., Kaspar, C.W., 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1390–1399.
- Shere, J.A., Kaspar, C.W., Bartlett, K.J., Linden, S.E., Norell, B., Francey, S., Schaefer, D.M., 2002. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle housed in a confined environment following waterborne inoculation. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1947–1954.
- Singh, R.S., Ranganathan, B., 1980. Heat resistance of *Escherichia coli* in cow and buffalo milk. *Journal of Food Protection* 43, 376–380.
- Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., Milton, T., Klopfenstein, T., 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *Journal of Food Protection* 64, 1899–1903.
- Smith, D.R., Moxley, R.A., Peterson, R.E., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E., Clowser, S.L., 2008. A two-dose regimen of a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 type III secreted proteins reduced environmental transmission of the agent in a large-scale commercial beef feedlot clinical trial. *Foodborne Pathogens and Disease* 5, 589–598.
- Solecki, O., MacRae, M., Strachan, N., Lindstedt, B.A., Odgen, I., 2009. *E. coli* O157 from sheep in Northeast Scotland: prevalence, concentration shed and molecular characterization by multilocus variable tandem repeat analysis. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 849–854.
- Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A.S., Pournaras, S., Rodi Burriel, A., Kritas, S.K., Papageorgiou, D.K., 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of

- Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiology* 26, 865–871.
- Son, I., Van Kessel, J.A., Karns, J., 2009. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 837–847.
- Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy, A., Massa, S., 2003. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology* 36, 73–76.
- Sperber, W.H., 1983. Influence of water activity on foodborne bacteria – a review. *Journal of Food Protection* 46, 142–145.
- Stefan, A., Scaramagli, S., Bergami, R., Mazzini, C., Barbanera, M., Perelle, S., Fach, P., 2007. Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 337–342.
- Stephan, R., Buehler, K., 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bulk-tank milk samples from north-east Switzerland. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 52, 122–123.
- Stephan, R., Kuhn, K., 1999. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine colic mastitis and their antibiotic resistance patterns. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 46, 423–427.
- Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J., Beutin, L., 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science* 91, 2561–2565.
- Strachan, N.J.C., Doyle, M.P., Kasuga, F., Rotariu, O., Ogden, I.D., 2005. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* 103, 35–47.
- Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Mary, E., Locking, M.E., Reid, T.M.S., Ogden, I.D., 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology* 112, 129–137.
- Strawn, L.K., Danyluk, M.D., 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology* 138, 78–84.
- Syngde, B.A., Chase-Topping, M.E., Hopkins, G.F., McKendrick, I.J., Thomson-Carter, F., Gray, D., Rusbridge, S.M., Munro, F.I., Foster, G., Gunn, G.J., 2003. Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiology and Infection* 130, 301–312.
- Tchaptchet, S., Hansen, J., 2011. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. *Gut Microbes* 2, 347–352.
- Thomas, K.M., McCann, M.S., Coltery, M.M., Logan, A., Whyte, P., McDowell, D., Duffy, G., 2011. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *International Journal of Food Microbiology* 153, 288–296.
- Thomson, D.U., Loneragan, G.H., Thornton, A.B., Lechtenberg, K.F., Emery, D.A., Burkhardt, D.T., Nagaraja, T.G., 2009. Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 871–877.
- Thornton, A.B., Thomson, D.U., Loneragan, G.H., Fox, J.T., Burkhardt, D.T., Emery, D.A., Nagaraja, T.G., 2009. Effects of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccination on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle. *Journal of Food Protection* 72, 866–869.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T., Pallen, M.J., 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14941–14946.
- Tzschoppe, M., Martin, A., Beutin, L., 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 152, 19–30.
- Upton, P., Coia, J.E., 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet* 344, 1015.
- Usajewicz, I., Nalepa, B., 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in milk exposed to high temperatures and high pressure. *Food Technology and Biotechnology* 44, 33–39.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., Lejeune, J., Klashinsky, S., 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Canadian Veterinary Journal* 42, 714–720.
- Van Kessel, J.A., Karns, J.S., Lombard, J.E., Koprak, C.A., 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection* 74, 759–768.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Ray-Gueniot, S., 2002. Présence d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau: un problème en santé publique. *Revue de Médecine Vétérinaire* 153, 235–242.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Berardin, M., Bavai, C., Beutin, L., 2005a. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Letters in Applied Microbiology* 41, 235–241.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Crucaudet, C., Bavai, C., Montet, M.P., Bonin, V., Dernburg, A., Richard, Y., 2005b. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 105, 83–88.
- Verstraete, K., De Zutter, L., Messens, W., Heman, L., Heyndrickx, M., De Reu, K., 2010. Effect of the enrichment time and immunomagnetic separation on the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive O157 from artificially inoculated cattle faeces. *Veterinary Microbiology* 145, 106–112.
- Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A.K., Korber, D.R., 2011. Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of rpoS. *International Journal of Food Microbiology* 146, 163–169.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M.L., 2006. 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, 102–108.
- Vinten, A.J.A., Potts, J., Avery, L., Strachan, N.J.C., 2009. Microbial pollution of water by livestock: approaches to risk assessment and mitigation. *Animal* 3, 744–752.
- Voitoux, E., Lafarge, V., Collette, C., Lombard, B., 2002. Applicability of the draft standard method for the detection of *Escherichia coli* O157 in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 77, 213–221.
- Vosough Ahmadi, B., Frankena, K., Turner, J., Velthuis, A.G., Hogeveen, H., Huirne, R.B., 2007. Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *E. coli* O157:H7 in lactating cows in dairy herds. *Veterinary Research* 38, 755–771.
- Wahi, S., Bansal, S., Ghosh, M., Ganguli, A., 2006. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and storage of Indian cheese (Paneer). *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 184–189.
- Wall, P.G., McDonnell, R.J., Adak, G.K., Cheasty, T., Smith, H.S., Rowe, B., 1996. General outbreaks of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Communicable Diseases Report: CDR Reviews*, 6, pp. R26–R33.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L., Bark, D.H., 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection* 57, 629–631.
- Wells, J.G., Shipman, L.D., Greene, K.D., Sowers, E.G., Greene, J.H., Camron, D.N., Downes, F.P., Martin, M.L., Griffin, P.M., Ostroff, S.M., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 985–989.
- Wendel, A.M., Johnson, D.H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J.R., Monson, T., Koschmann, C., Davis, J.P., 2009. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August–September 2006: the Wisconsin investigation. *Clinical Infectious Diseases* 48, 1079–1086.
- Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P., Magnuson, R.J., 2006. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *Journal of Dairy Science* 89, 3408–3412.
- Wetzel, A.N., Lejeune, J.T., 2006. Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in Northeast Ohio. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2621–2626.
- Widiashi, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S., Shinagawa, K., 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiology and Infection* 132, 67–75.
- Williams, A.P., Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1075–1083.
- Wilson, J.B., McEwen, S.A., Clarke, R.C., Leslie, K.E., Walter-Toews, D., Gyles, C.L., 1993. Risks factors for bovine infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Ontario, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 16, 159–170.
- Wood, J.C., McKendrick, I.J., Gettinby, G., 2007. A simulation model to assess herd-level intervention strategies against *E. coli* O157. *Epidemiology and Infection* 135, 749–764.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A., 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology* 39, 155–158.
- Zdragas, A., Samouris, G., Filiouis, G., Petridou, E., Giantzi, V., 2009. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's and goat's milk in Greece. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 60, 36–38.
- Ziebell, K., Konczyk, P., Yong, I., Frost, S., Mascarenhas, M., Kropinski, A.M., Whittam, T.S., Read, S.C., Karmali, M.A., 2008. Applicability of phylogenetic methods for characterizing the public health significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1671–1675.
- Zschöck, M., Hamann, H.P., Kloppert, B., Wolter, W., 2000. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Letters in Applied Microbiology* 31, 203–208.
- Zweifel, C., Rusch, M., Corti, S., Stephan, R., 2006. Determination of various microbiological parameters in raw milk and raw milk cheese produced by bio-farms. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 57, 13–16.
- Zweifel, C., Giezendanner, N., Corti, S., Krause, G., Beutin, L., Danuser, J., Stephan, R., 2010. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. *Journal of Food Protection* 73, 88–91.

Annexe 5 – Publication 2.

Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses.

Miszczycha SD, Perrin F, Ganet S, Jamet E, Tenenhaus-Aziza F, Montel MC, Thevenot-Sergentet D.

Applied and Environmental Microbiology. 2013. Jan; 79 (1) : 150-8.

Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses

Stéphane D. Miszczycha,^{a,b} Frédérique Perrin,^c Sarah Ganet,^{a,d} Emmanuel Jamet,^c Fanny Tenenhaus-Aziza,^b Marie-Christine Montel,^e Delphine Thevenot-Sergentet^{a,d}

Université de Lyon, CALITYSS-EMSA-VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France^a; Centre National de l'Interprofession et de l'Economie Laitière (CNIEL), Paris, France^b; Actilait, La Roche-sur-Foron, France^c; LMAP-NRL STEC-VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France^d; URF-INRA UR545, Aurillac, France^e

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important cause of food-borne illness. The public health implication of the presence of STEC in dairy products remains unclear. Knowledge of STEC behavior in cheeses would help to evaluate the human health risk. The aim of our study was to observe the growth and survival of experimentally inoculated STEC strains in raw-milk cheeses manufactured and ripened according to five technological schemes: blue-type cheese, uncooked pressed cheese with long ripening and with short ripening steps, cooked cheese, and lactic cheese. Cheeses were contaminated with different STEC serotypes (O157:H7, O26:H11, O103:H2, and O145:H28) at the milk preparation stage. STEC growth and survival were monitored on selective media during the entire manufacturing process. STEC grew (2 to 3 log₁₀ CFU · g⁻¹) in blue-type cheese and the two uncooked pressed cheeses during the first 24 h of cheese making. Then, STEC levels progressively decreased in cheeses that were ripened for more than 6 months. In cooked cheese and in lactic cheese with a long acidic coagulation step (pH < 4.5), STEC did not grow. Their levels decreased after the cooking step in the cooked cheese and after the coagulation step in the lactic cheese, but STEC was still detectable at the end of ripening and storage. A serotype effect was found: in all cheeses studied, serotype O157:H7 grew less strongly and was less persistent than the others serotypes. This study improves knowledge of the behavior of different STEC serotypes in various raw-milk cheeses.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is recognized as an important cause of food-borne illness. Pathogenic STEC (also called enterohemorrhagic *E. coli* [EHEC]) is associated with severe human disease such as bloody diarrhea and in some dramatic cases hemolytic-uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) (1, 2). Human infection is typically acquired through the ingestion of contaminated food (raw ground beef, dairy products, vegetables, etc.) or water (3–8).

Escherichia coli O157:H7 was the first STEC serotype isolated in the early 1980s and is implicated in the majority of the outbreaks and HUS cases (6, 9). However, other serotypes, such as *E. coli* O26:H11, *E. coli* O103:H2, *E. coli* O145:H28, and *E. coli* O111:H8, have also been implicated in outbreaks (10).

Cattle are the main animal reservoir of STEC (6). Infected cattle can carry the bacteria in their gastrointestinal tract without any symptoms of disease (11, 12) and shed them in their feces (13). However, these pathogens have also been isolated from the feces of other species of domestic animals, including goats and sheep (14). These animals seem to carry *E. coli* serogroups different from those carried by cattle (O26, O91, O115, O128, and O130) (15). Virulence genes or STEC strains have been found in raw milk and raw-milk cheeses (16–18). Detailed investigations have shown that milk can become contaminated during milking or processing if hygiene rules are not followed (19). Once milk has been contaminated with STEC, the organisms can be present in milk products. Cheeses have been characterized as safe food by some authors (19). Nevertheless, outbreaks involving cheeses have been reported worldwide (3, 16, 20–22). The presence of pathogenic bacteria, including STEC, in cheeses is a major concern for food safety authorities. To address the problem, the U.S. Food and Drug Administration requires a minimum of 60 days' aging for cheeses made from unpasteurized milk (23, 24).

To date, most authors have focused their work on the behavior of *E. coli* O157:H7 during cheese manufacturing (23–29), but little is known about the behavior of other STEC serotypes.

The aim of this study was to extend knowledge of the behavior of O157:H7 and non-O157:H7 STEC strains in different types of cheese. To this end, the behavior of different STEC serotypes was evaluated during cheese making (0 to 72 h, depending on the cheese type) and the ripening and storage of cheeses prepared according to the methods for the main five cheese types: blue-veined cheese (raw sheep's milk), lactic cheese (LC; raw goat's milk), cooked cheese (CC; raw cow's milk), and two uncooked pressed cheeses (UPCs; raw cow's milk).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Eight different strains were used in the present study (Table 1): three *E. coli* O26:H11, two *E. coli* O103:H2, one *E. coli* O145:H28, and two *E. coli* O157:H7 strains. The serotypes tested were chosen according to their pathogenicity (classification of verotoxigenic *E. coli* serotypes into the seropathotypes described by Karmali et al. [35]) and their prevalence in dairy products (16, 36). They were all isolated from milk products and carried the virulence genes *eae* and either *stx*₁ or *stx*₂ (30, 32). All strains were kept in cryobeads (AEB 400100; AES Laboratories, Combourg, France) and maintained at –80°C.

Received 11 July 2012 Accepted 8 October 2012

Published ahead of print 19 October 2012

Address correspondence to Delphine Thevenot-Sergentet, delphine.sergentet@vetagro-sup.fr.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02192-12

TABLE 1 Strains used in this study^a

Serotype	Name (origin) ^b	Virulence genes	Cheese tested				
			BTC	UPC1-LR	UPC2-SR	CC	LC
O26:H11 ^d	7501A (raw cow's milk cheese)	<i>eae</i> , ^e <i>stx</i> ₁ ^e		X ^f	X ^f		X ^f
	L23A (sheep's milk)	<i>eae</i> , <i>stx</i> ₁	X ^f		X ^f	X ^g	X ^f
	F15338 (raw cow's milk cheese)	<i>eae</i> , <i>stx</i> ₁			X ^f		X ^f
O103 ^h :H2 ^c	F73120 (raw cow's milk cheese)	<i>eae</i> , <i>stx</i> , <i>stx</i> ₁			X ^f		X ^f
	F12983a (sheep's milk)	<i>eae</i> , <i>stx</i> , <i>stx</i> ₁	X ^f		X ^f		X ^f
O145:H28 ^d	F324 (raw cow's milk cheese)	<i>eae</i> , <i>stx</i> ₂			X ^f		X ^f
O157:H7 ⁱ	721.4 (sheep's milk)	<i>eae</i> , <i>stx</i> ₂	X ^f	X ^f	X ^f	X ^g	X ^f
	6222-16,3 (raw goat's milk cheese)	<i>eae</i> , <i>stx</i> ₂			X ^f		X ^f

^a BTC, blue type cheese; UPC1-LR, uncooked pressed cheese with long ripening step; UPC2-SR, uncooked pressed cheese with short ripening step; CC, cooked cheese; LC, lactic cheese.

^b All the strains used were obtained from the French National Reference Laboratory of STEC.

^c Confirmed by the protocol described by Perelle et al. (30).

^d Confirmed by the protocol described by Madic et al. (31).

^e Confirmed by the protocol described by Nielsen et al. (32).

^f $n = 3$.

^g $n = 2$.

^h Confirmed by the protocol described by Perelle et al. (33).

ⁱ Confirmed by the protocol described by Miszczycha et al. (34).

Inocula. Each strain was revived in 10 ml brain heart infusion (BHI; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) by incubation at 37°C for 24 h. Then, 100 μ l was transferred into 10 ml of buffered peptone water (BPW; bioMérieux), incubated at 37°C for 24 h, and stored at 8°C for 48 h in order to simulate the storage conditions of milk and to cold adapt the strains. After turbidity measurements (Densimat photometer; bioMérieux), the cold-adapted strains were diluted in order to inoculate the raw milk during the maturation step, before renneting at 10^2 CFU \cdot ml⁻¹ (Fig. 1). The inoculation level was checked by plating inocula on plate count agar (PCA; bioMérieux). Colonies were enumerated after 24 h of incubation at 37°C.

All the strains were tested with the smallest cheeses with a short ripening step (uncooked pressed cheese with a short ripening step and lactic cheese). Only a small number of strains were tested in blue-type cheese (BTC), uncooked pressed cheese with a long ripening step, and cooked cheese, which involve more complicated logistics (according to the size and weight of the cheeses and because of storage during ripening for >4 months). More precisely, *E. coli* O157:H7 and O26:H11 were tested because of their implication in cheese outbreaks (3, 16, 37). Different strains of serotypes O103:H2 and O145:H28 were also tested because of their pathogenicity and the lack of information about their behavior in raw-milk cheeses. Strains from the lab collection were selected according to their origin and the type of cheese; e.g., for cheese made with sheep's milk, only STEC strains isolated from sheep dairy products were chosen. There was an exception for serotype O157:H7 because owing to its low prevalence in cow's milk dairy products, no *E. coli* O157:H7 isolate from such a source was available in our collection. All strains were separately inoculated into raw milk before the coagulation step, in triplicate (except for the cooked cheese technology, where $n = 2$) (Table 1).

Cheese making. Cheeses were made in an experimental cheese dairy facility at the Unité de Recherches Fromagères (URF; INRA) in Aurillac, France, using five different cheese-making schemes. Five different cheeses were prepared to be representative of the main cheese technology schemes defined by Lenoir et al. (38). Then, blue-veined cheese (BTC) with raw sheep's milk, CC, UPC (with a long ripening step [UPC1-LR] or with a short ripening step [UPC2-SR]) with raw cow's milk, and LC with raw goat's milk were prepared. The main steps of the process distinguishing them are summarized in Fig. 1. The details of cheese making were previously described in a review of cheese-making technology (39, 40).

For each trial, cheeses were checked for the absence of *E. coli* O26:H11, O103:H2, O145:H28, or O157:H7 in raw milk.

Physicochemical analysis of cheese. The different analysis points at the different stages of the cheese making and ripening were chosen ac-

ording to the cheese-making schemes and the advice of cheese producers. The pH was measured directly in the core of the cheese. For the surfaces (when possible), the rind was homogenized before the analysis. pH was measured with a 926 VTV pH meter with an Ingold 406 MX electrode (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France). The values of water activity (a_w) in all cheeses were measured by a LabMaster-aw apparatus (Novasina, Lachen, Switzerland). Lactate content was determined by the enzymatic method at the LARF laboratory (LARF-Actilait, Mamirolle, France).

Sampling, counting, and detection of STEC strains. Samples for enumerating STEC strains were taken from milk and from cheese in cores and rinds (only for the two UPCs and CC for the rinds) during different stages of cheese making, ripening, and storage, depending on the cheese-making scheme tested. These analysis points represented potential steps which could have an impact on STEC behavior (because of pH, temperature, etc.). Aseptically collected samples of 50 ml milk or 50 g cheese were diluted (1:5) in sterile BPW and homogenized for 60 s in a stomacher (AES Laboratories). Further decimal dilutions were performed with sterile tryptone salt (TS; bioMérieux) and spread onto selective agar.

For enumeration of serogroup O157 strains, 100 μ l of each sample was plated onto specific O157:H7 ID medium (bioMérieux) and SMAC medium (Biokar, Beauvais, France) to which 0.05 mg \cdot liter⁻¹ of cefixime and 2.5 mg \cdot liter⁻¹ of tellurite were added in order to inhibit other flora. The same medium was used without antibiotic in order to facilitate the isolation of stressed bacteria.

For enumeration of serogroups O26, O103, and O145, 100 μ l of each sample was plated onto specific coli ID medium (bioMérieux) and the specific medium described by Possé et al. (41).

All enumerations were performed in triplicate. After incubation for 24 h at 37°C, presumptive bacteria were tested by reverse transcription-PCR (RT-PCR) as described below.

When a strain in a sample could not be enumerated, an enrichment step was performed and STEC strain detection was performed to check whether the target strain was still present. More precisely, the remaining enrichment broth was supplemented with acriflavine and incubated for 24 h at 37°C for serogroups O103 and O145 and 24 h at 41.5°C for serogroups O26 and O157 (42). Immunomagnetic separation (IMS) using beads coated with specific antibodies against the serogroup of the target strain was performed with Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). IMS was performed according to the manufacturer's instructions. The resulting IMS solutions were plated onto a selective differential agar medium as described above. All enrichment broths were also plated

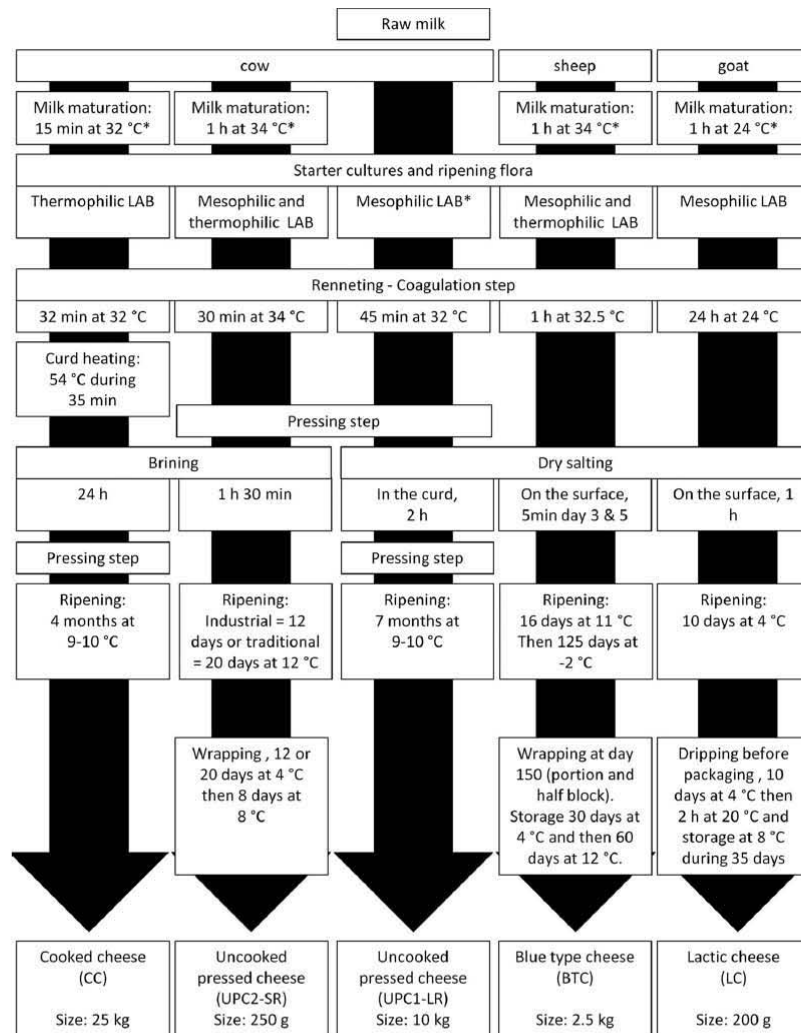


FIG 1 Flow diagram of the characteristics of the different cheese-making schemes tested. LAB, lactic acid bacteria; *, inoculation of STEC.

directly onto the selective differential agars. After 24 h of incubation at 37°C, presumptive colonies were tested by RT-PCR as described below.

Confirmation and characterization of the target bacteria by real-time PCR. For DNA extraction, a single colony was boiled in DNA- and DNase-free water for 15 min and then centrifuged for 3 min at 13,000 × g. The supernatant containing the DNA was stored at -20°C until used.

Determination of the virulence genes *eae* and *stx*₁ or *stx*₂ was performed using the protocols described by Nielsen et al. (32) and Perelle et al. (30). Confirmation of the presence of *E. coli* O157:H7, the O antigens of *E. coli* O26, O103, and O145, and the flagellar H2, H11, and H28 antigen genes was performed using the protocols described by Miszczucha et al. (34), Perelle et al. (30, 33), and Madic et al. (31), respectively. Each reaction mixture (30 µl) comprised 1 × TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), primers and probes concentrated according to the authors' indications, 1 × IPC mix and IPC DNA

(TaqMan exogenous internal positive control reagents; Applied Biosystems), molecular-grade H₂O, and 3 µl of template DNA.

Thermal cycling and detection were performed using a StepOne Plus system (Applied Biosystems). The generation of fluorescence for each sample was monitored at the end of each elongation step. A fluorescent signal 10 times higher than the standard deviation (SD) of the mean baseline emission was indicative of a positive detection. The threshold cycle was defined as the PCR cycle at which the fluorescence intensity rose above the baseline (30).

Statistical analysis. To study the effect of the strain (in LC and UPC2-SR), serotype (in BTC, CC, LC, and the two UPCs), type of ripening (in UPC2-SR), and storage mode (in BTC) on the behavior of STEC throughout the manufacturing process, a linear model describing the amount of STEC on a decimal logarithmic scale as a function of two dependent variables, time of measurement and the effect studied, was used. Each

model was therefore written $Y = X\beta + \epsilon$, where Y is the independent variable and represents the vector of observed data (counts) on the log scale, X is the dependent variable studied (strains, serotype, time of ripening, or storage mode), β is an unknown vector of fixed-effects parameters, and ϵ is an unknown random-error vector modeling the statistical noise around $X\beta$.

As measurements were repeated at irregular intervals, a continuous-time model was needed to describe the covariance among the errors. The spatial power covariance structure in the Mixed procedure of SAS (version 9.2) was used.

For each technology, when different strains of the same serotype were used, we first tested the strain effect by serotype. If the strain factor had no significant effect, then the curves were used to test the serotype effect. Additionally, the impacts of the ripening time and the storage conditions were tested for UPC2-SR (traditional versus industrial ripening) and for BTC (two different storage conditions), respectively. The fixed effect was considered significant when the P value computed by the F test was less than 5%.

RESULTS

BTC (sheep's milk). (i) *E. coli* O157:H7, O26:H11, and O103:H2 behavior. Only one strain each of *E. coli* O26:H11, *E. coli* O103:H2, and *E. coli* O157:H7 was tested in triplicate for BTC (Table 1).

In the cheese core, the level of STEC increased by $1 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ for the O157:H7 strain during the first 24 h of manufacture, whereas the *E. coli* O26:H11 and O103:H2 strain concentrations increased by $3 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ and $2 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively (Fig. 2). Seven days after curding, the concentration of the *E. coli* O157:H7 strain decreased rapidly and remained detectable only after enrichment, but at 240 days it could not be isolated even after enrichment. The level of *E. coli* O26:H11 decreased during ripening and was detected only after enrichment at 240 days. The level of *E. coli* O103:H2 decreased during ripening, and at day 240, the strain was undetectable even after enrichment. Whatever the storage mode, the growth of the *E. coli* O26:H11 strain was significantly higher, and this serotype was more persistent than the other serotypes ($P < 0.002$).

Whatever the serotype, the storage mode of BTC had no significant effect on STEC behavior ($P > 0.9$ for the three serotypes).

(ii) **Physicochemical characteristics.** Whatever the STEC serotype inoculated, the pH in the cheese cores decreased from 6.6 to 4.91 during the first 3 days and increased until day 90, reaching 6.69, and then decreased again (Fig. 3). Lactate content was $1,179 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 41 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) at 4 days and decreased during ripening; at day 150, it was only $638 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 209 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). The a_w in the cheese core gradually decreased to reach 0.898 ($\text{SD} = 0.006$) at day 240.

UPC1-LR (cow's milk). (i) *E. coli* O157:H7 and O26:H11 behavior. Only one strain each of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 was tested in triplicate for UPC1-LR (Table 1).

For UPC1-LR, the concentration of the *E. coli* O26:H11 strain reached $6 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ during the first 24 h of cheese making, whereas the concentration of the *E. coli* O157:H7 strain reached only $4 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 2). The STEC concentration remained constant between day 1 and day 60. Their levels declined during ripening and after day 210 dropped below the enumeration limit for the *E. coli* O157:H7 strain in the rind and core and for the *E. coli* O26:H11 strain in the rind. *E. coli* O26:H11 levels decreased more slowly in the core than in the rind and were still at a concentration of $3 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ at day 240. The level of *E. coli* O26:H11 was

significantly higher than that of *E. coli* O157:H7 both in the core ($P < 0.0001$) and in the rind ($P = 0.0018$).

(ii) **Physicochemical characteristics.** Whatever the STEC serotype inoculated, the cheese core pH decreased from 6.79 to 5.19 during the first day and then increased slowly in the core to reach 5.52 at day 240 (Fig. 3). In the rind, the pH increased slowly from 7.34 at day 60 to 7.64 at day 240. Lactate content remained stable at about $1,145 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 80 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) during ripening.

In the core of the cheese, a_w decreased slowly to reach 0.943 ($\text{SD} = 0.002$) at day 240. In the rind, a_w decreased from 0.941 ($\text{SD} = 0.001$) at day 60 to 0.922 ($\text{SD} = 0.001$) at day 240.

UPC2-SR (cow's milk). (i) *E. coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, and O145:H28 behavior. Three strains of *E. coli* O26:H11, two strains of *E. coli* O103:H2, one strain of *E. coli* O145:H28, and two strains of *E. coli* O157:H7 were tested in triplicate (Table 1).

As observed with UPC1-LR, the concentrations of all four serotypes increased during the first 24 h of manufacturing (Fig. 2). At day 1, the levels of all strains of *E. coli* O103:H2 and *E. coli* O145:H8 reached $5 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$. The levels of all the *E. coli* O26:H11 strains increased to reach 4 to $5 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$. The level of the *E. coli* O157:H7 strains reached $3.3 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$. During ripening and storage, the concentrations of the different STEC strains remained constant until the end, at day 40. For the same serotype, there was no significant difference between the strains tested. Whatever the serotype, no significant difference in the levels in the core and the rind ($P > 0.46$ for the core and the rind) was observed between traditional (which lasts 20 days) and industrial (which lasts 12 days) ripening conditions. Whatever the ripening conditions (traditional or industrial), the levels of serotypes O103:H2 and O145:H28 were significantly similar in the core ($P = 0.915$ for traditional ripening; $P = 0.365$ for industrial ripening) and in the rind ($P = 0.43$ for traditional and industrial ripening). The levels of serotypes O26:H11 and O145:H28 were also significantly the same in the rind ($P = 0.22$ for traditional ripening; $P = 0.07$ for industrial ripening).

The level of serotype O26:H11 was significantly lower than that of O145:H28 in the core and that of serotype O103:H2 in the core and in the rind ($P < 0.05$). The level of serotype O157:H7 was significantly lower than the levels of serotypes O26:H11, O103:H2, and O145:H28 in the core and in the rind ($P < 0.05$).

(ii) **Physicochemical characteristics.** Whatever the STEC serotype inoculated, the cheese core pH decreased from 6.6 to 5.3 during the first day. It increased slowly after day 5 to reach 5.80 at day 40 (Fig. 3). Lactate content at day 20, $1,109 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 61 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), was higher than that at day 5, $996 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 152 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), and that at day 32, $649 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\text{SD} = 88 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

The a_w in the cheese core remained constant, with a value of 0.974 ($\text{SD} = 0.0023$) at day 40. In the rind, a_w remained constant with a value of 0.980 ($\text{SD} = 0.0033$) at day 40.

CC (cow's milk). (i) *E. coli* O157:H7 and O26:H11 behavior. Only one strain each of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 was tested in duplicate (Table 1).

During the first hours of cheese making, no growth was observed in any of the STEC serotypes (Fig. 2): no *E. coli* O26:H11 or *E. coli* O157:H7 was enumerated at 1.75 h after their inoculation. Then, throughout the ripening for both the core and the rind, strains could be isolated only after enrichment. There was no serotype effect for the CC technology ($P = 0.249$ for the core; $P =$

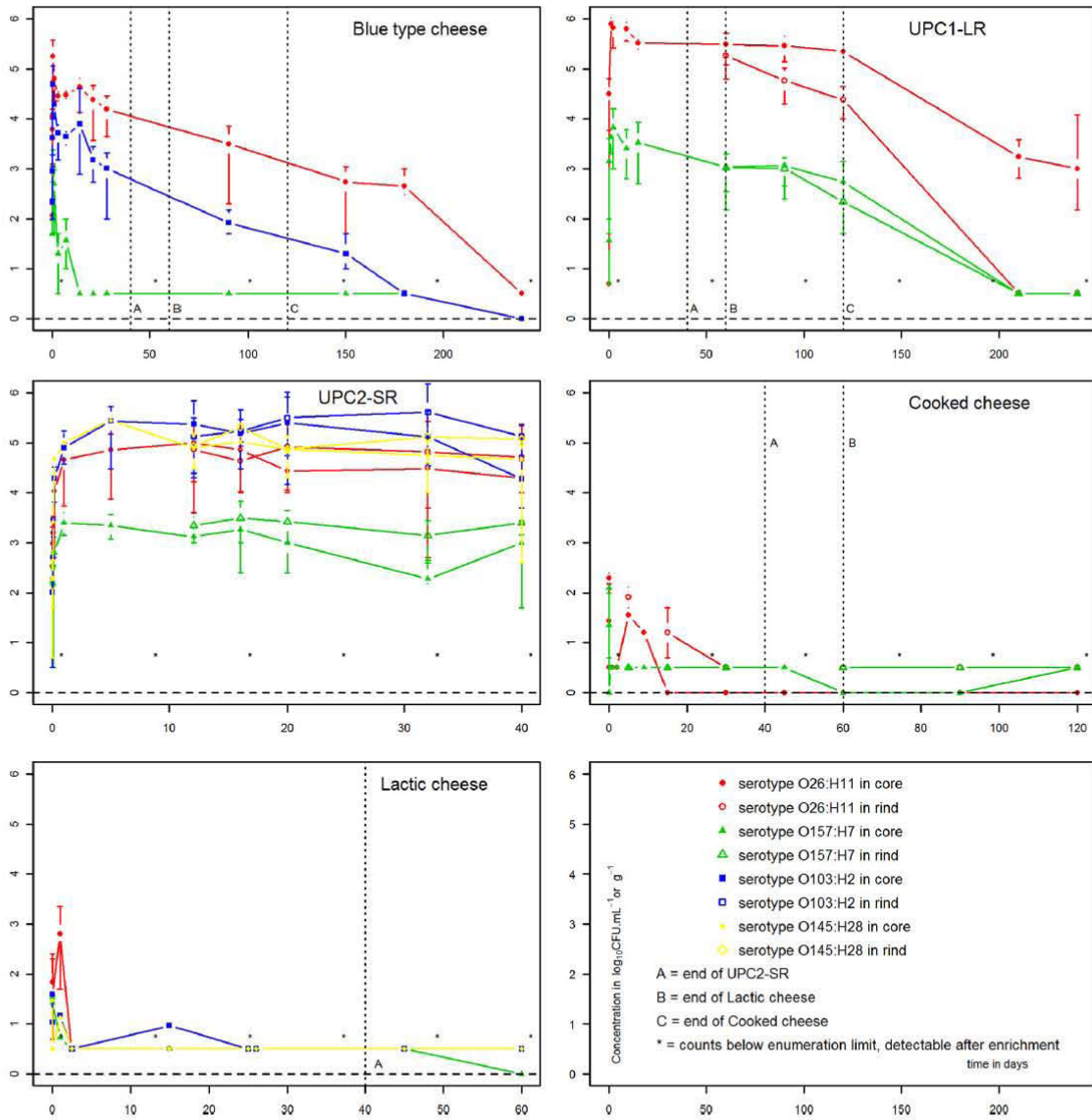


FIG 2 Average counts (y axis, in log₁₀ numbers of CFU per milliliter or per gram) of the different STEC serotypes during the manufacture of the different cheeses tested. The end of the shorter technologies is indicated in order to visualize the impact of time on STEC behavior. Vertical bars represent minimal and maximal enumeration values.

0.349 for the rind). In the core, at day 120, the *E. coli* O157:H7 strain was isolated in only one of the two replicates after enrichment. No *E. coli* O26:H11 strains were isolated. In the rind, strains were isolated after enrichment for both replicates of the O26:H11 strain and for only one replicate of the O157:H7 strain.

(ii) Physicochemical characteristics. Whatever the STEC serotype inoculated, during the first hours of cheese making, the pH decreased from 6.6 to 5.38 in the cheese core and remained stable

for 1 month. It then increased slowly, reaching 5.82 at day 120. Lactate content increased from 665 mg · 100 g⁻¹ (SD = 65 mg · 100 g⁻¹) at 22 h to 1,329 mg · 100 g⁻¹ (SD = 115 mg · 100 g⁻¹) at day 45 and then decreased to 1,034 mg · 100 g⁻¹ (SD = 64 mg · 100 g⁻¹) at day 120.

In the cheese core, *a_w* remained stable between day 5 and day 15 and then decreased, reaching 0.975 (SD = 0.0027) at day 120. In the rind, *a_w* increased from 0.974 (SD = 0.0035) to 0.980 (SD =

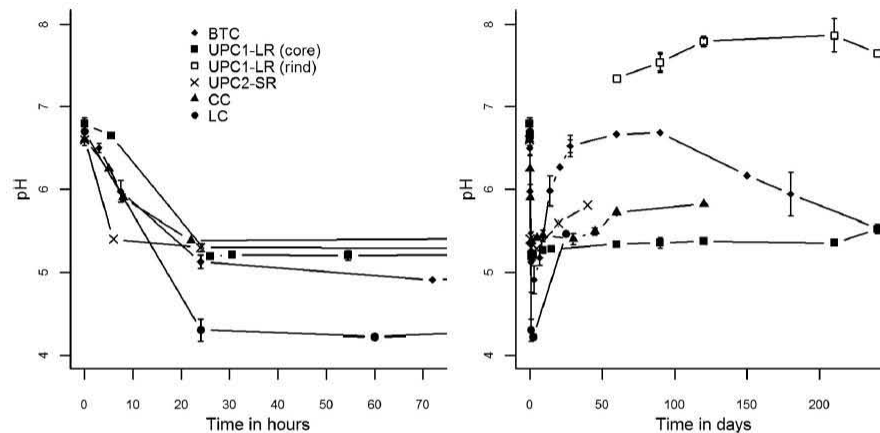


FIG 3 Evolution of the pH values (average counts) during the first hours of cheese making and during the ripening and storage of the cheeses. CC, cooked cheese.

0.0025) between day 15 and day 45 and then decreased to 0.964 (SD = 0.0038) at day 120.

LC (goat's milk). (i) *E. coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, and O145:H28 behavior. Three strains of *E. coli* O26:H11, two strains of *E. coli* O103:H2, one strain of *E. coli* O145:H28, and two strains of *E. coli* O157:H7 were tested in triplicate (Table 1).

During the first hours of cheese making the levels of serotypes O103:H2, O145:H28, and O157:H7 were the same as those in milk (Fig. 2). The concentrations of the three *E. coli* O26:H11 strains increased by only 1 log₁₀ CFU · g⁻¹ and decreased until the end of the coagulation step (24 h). As observed for BTC and UPC1-LR, the increase in the serotype O26:H11 count was significantly higher than that for the other serotypes: $P = 0.0054$ for O26:H11 versus O103:H2, $P < 0.0001$ for O26:H11 versus O157:H7, and $P = 0.0126$ for O26:H11 versus O145:H28. In contrast, there was no difference between serotypes O103:H2, O145:H28, and O157:H7, in pairs. The behavior of strains belonging to the same serotype was significantly similar. At the end of the demolding step (60 h), no strains were enumerable, though they could still be detected after enrichment. During ripening and storage, STEC levels remained detectable. Nevertheless, at day 60, four strains (one *E. coli* O26:H11 strain [strain 7501A], one *E. coli* O103:H2 strain [strain F73120], and the two *E. coli* O157:H7 strains) could not be isolated even after enrichment, whereas the other strains remained present.

(ii) Physicochemical characteristics. Whatever the STEC serotype inoculated, the pH decreased dramatically to reach 4.21 at day 2 and then increased slowly to reach 5.26 at day 25 (Fig. 3). Lactate content decreased from 801 mg · 100 g⁻¹ (SD = 46 mg · 100 g⁻¹) at day 2 to 343 mg · 100 g⁻¹ (SD = 122 mg · 100 g⁻¹) at day 25.

a_w decreased in the core of the cheese from 0.994 (SD = 0.001) at day 2 to 0.967 (SD = 0.0038) at day 45.

DISCUSSION

In this study, the fate of four STEC serotypes was examined during cheese making and the ripening and storage of raw-milk cheeses prepared according to five different schemes. Currently, *E. coli*

O157:H7 is the most studied serotype and the most often implicated in outbreaks of STEC illness from dairy products. To our knowledge, this is the first time that the behavior of serotypes O26:H11, O103:H2, and O145:H28 has been monitored during cheese manufacturing and compared with the behavior of serotype O157:H7. The behavior of STEC during cheese making and ripening varied according to the cheese-making schemes. Each cheese type has its own physicochemical parameters (pH, temperature, a_w) that can affect the growth or the survival of STEC.

Factors that inhibit STEC growth. Our results showed that two physicochemical factors seem to inhibit the growth of the STEC during the first hours of cheese making. The first was sudden, rapid acidification. In the case of LC, the coagulation step lasted 24 h at 18°C with a rapid decrease in pH (under 4.3). *E. coli* is not able to grow at this pH value (43). After this step, STEC remained detectable only after enrichment. The findings of an earlier study led by Vernozy-Rozand et al. (44) confirm our results. They observed that *E. coli* O157:H7 artificially inoculated into raw goat's milk at 2 log₁₀ CFU · ml⁻¹ decreased during the first 24 h of goat's milk acid cheese making (pH 4.3). Their results showed that after removal from the mold, STEC was recovered only after enrichment. They isolated STEC after enrichment in their lactic cheese even after 42 days of ripening, which is in agreement with our results.

The second factor influencing STEC growth is high temperature. In CC, after heating the curd at 54°C for 35 min (1 h after STEC inoculation in the milk and before pressing) (45), STEC was isolated only after enrichment. Different studies have shown that *D* values (decimal reduction time) are strain, serotype, and food matrix dependent. Authors have observed *D* values of 31 min at 50°C (46), 11.51 at 55°C (47) in turkey, between 2.14 and 8.32 min at 56°C in apple juice (48), and 6.6 min at 55°C (46) and between 0.95 and 4.98 min at 58°C (49) in milk. It has also been observed that cooking temperatures of 53°C or higher result in a rapid decrease in STEC populations during the first hours of cheese making and contribute to the safety of this type of cheese (50). In our study, during ripening, these pathogens remained detectable only after enrichment. Usajewicz and Nalepa (51) observed that at

55°C, *E. coli* cells in milk were inactivated after 180 min. Even if these bacterial strains were stressed and damaged, the authors demonstrated that under optimum conditions (37°C) they were able to repair the damage, whereas storage at 7°C inhibited their regeneration and growth. In the CC scheme, the cheeses are ripened at 9°C, which could explain the inability of surviving STEC to grow after the cooking step.

Factors enabling STEC rates to increase. An increase in the levels of STEC was observed in BTC and the two UPCs. During the first hours of cheese making, the increase in numbers is due to the cell concentration during curd formation, which generally increases the STEC concentration by a factor of 5 for blue-type cheese or nearly 10 for the other cheese types (25, 29; our unpublished data). This increase can occur as a result of bacterial cell entrapment in the curd and contraction after whey expulsion. However, the rate of increase in STEC for the BTC and the two UPCs (approximately 0.5 to 2.5 log₁₀ CFU · g⁻¹, depending on the cheese-making scheme and serotype) clearly indicates bacterial growth. Schlessner et al. (24) have also observed a 1- to 2-log₁₀-CFU · g⁻¹ increase in an artificially inoculated cocktail of *E. coli* O157:H7 during cheddar cheese-making operations. At the initial stages of preparation of the BTC and the two UPCs, the temperature (>30°C) is ideal for STEC growth and the moderate acidification can only slow down this growth. Indeed, the pH did not fall below 5 in the BTC and the two UPCs during the first 24 h of cheese making. It has been demonstrated that *E. coli* O157:H7 can grow at a pH of 4.5 to 9 *in vitro* (43).

Factors allowing a decrease in STEC levels during ripening. The length of the ripening has an impact on STEC survival: during this step, *a_w* decreased (45). The minimum *a_w* for *E. coli* growth is 0.95 (52), and Glass et al. (53) observed that an *a_w* of 0.92 in cheese slices was sufficiently low to allow a decrease of STEC strains. In BTC, the *a_w* during the ripening was lower than the *a_w* observed for the other cheese-making schemes and fell below 0.90 at day 240. Moreover, cheeses were kept at -2°C between days 28 and 90. Negative temperatures combined with the decrease of *a_w* and acidic pH may reduce STEC populations even if STEC can survive in foods stored at refrigeration temperatures (54). For UPC1-LR, the decrease in *a_w* during ripening may also contribute to the decrease in STEC level after day 90. Interestingly, *a_w* decreased faster in the rind than in the core, but the pH remained constant at about 7.7 in the rind. This could explain the lower rate of *E. coli* O26:H11 in the rind than in the core at day 240. For BTC and UPC1-LR, viable strains were still isolated (after enrichment or not) at day 240. Our results are in agreement with those of Schlessner et al. (24), who have shown that populations of *E. coli* O157:H7 in cheese aged for 60 and 120 days at 7°C decreased less than 1 and 2 log₁₀ CFU · g⁻¹, respectively. Similarly, D'Amico et al. (23) observed that three strains of *E. coli* O157:H7 remained detectable after enrichment for more than 270 days in artificially inoculated cheddar and Gouda cheeses. These results are in agreement with those of others studies (23, 24) and confirm that the 60-day aging is effective for reducing all the STEC strains, as was observed for BTC, UPC1-LR, and CC, but cannot eliminate all the STEC cells.

Conversely, a short ripening step cannot achieve a significant reduction in *a_w*. This is the case for UPC2-SR. With this cheese, no decrease in STEC level was observed after the first stages of cheese making. This high stationary level has been previously described. Ramsaran et al. (55) observed that *E. coli* O157:H7 in cow's milk

inoculated at 4 log₁₀ CFU · ml⁻¹ survived at more than 6 log₁₀ CFU · g⁻¹ at the end of the storage period (75 days).

The survival of STEC during ripening and refrigerated storage of raw-milk cheese products may be affected by a combination of factors (time, pH, *a_w*, temperature). Indeed, multiple hurdles are often found to outperform a single hurdle (56).

Serotype effect. Statistically, no strain effect for the same serotype was observed in LC or UPC2-SR. However, we must bear in mind that only a few different strains were tested for each serotype. Similarly, D'Amico et al. (23) have shown no significant strain effect for the three *E. coli* O157:H7 strains employed in artificially inoculated cheddar cheese. Interestingly, a serotype effect was observed in BTC and the two UPCs, with less growth of the serotype O157:H7 strains than that of the serotype O26:H11, O103:H2, and O145:H28 strains being observed.

We can hypothesize that serotypes O26:H11, O103:H2, and O145:H28 may be better competitors than serotype O157:H7. *E. coli* O157:H7 is known to have lost its sorbitol fermentation and β-glucuronidase activity during its evolution (57). Other mutations may affect its behavior in dairy products. Furthermore, the *stx* genes are carried on lambdoid phages, and stresses are known to induce the lytic cycle of this prophage (58, 59). Perhaps if serotype O157:H7 is more sensitive than the other serotypes during cheese making, activation of the lambdoid prophage lytic cycle could reduce the *E. coli* O157:H7 population in the cheese. It will be necessary to test other *E. coli* O157:H7 strains from different origins or the particular sorbitol-fermenting *E. coli* O157:NM nonmotile (NM) strain.

In conclusion, this study has demonstrated that a heating step and sudden, rapid acidification allow efficient STEC removal for CC and LC. Conversely, moderate acidification and moderate temperatures allow these bacteria to grow in BTC and the two UPCs. In this case, STEC levels can be reduced by a long ripening step.

With BTC and UPC1-LR, most strains remained detectable after enrichment even after several months of ripening. However, one must bear in mind that the STEC strains were inoculated at high concentrations that were higher than those found in naturally contaminated milk. STEC levels at the end of ripening are lower in artisanal or industrial cheeses than they were in our experimental cheeses.

These data provide an interesting basis for assessing the final concentration in cheese under more realistic raw-milk contamination conditions, using a predictive microbiology and quantitative exposure assessment approach (60). It will be important to confirm the absence of a strain effect, as only a few strains of each serotype were tested here. Moreover, if the weak growth of *E. coli* O157:H7 is confirmed, it will be interesting to study the physiological state of this STEC serotype during cheese manufacture (stress, induction of lambdoid prophage, etc.). It will also be interesting to study the impact of the autochthonous milk microflora as well as starter lactic acid bacteria and molds on the behavior of STEC: Duffy et al. described these microorganisms to play an antagonistic role against STEC (61). Other authors, in contrast, have shown that *E. coli* growth was not affected by these bacteria (62) and that *Penicillium roqueforti* can enhance the growth and survival of *E. coli* O157:H7 *in vitro* (63). Future experiments will be necessary to understand the mechanisms involved in STEC inhibition during the making and ripening of cheeses.

ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank René Lavigne and Robert Didienne from the URF of the INRA and Fanny Pelissier, Isabelle Guillet, Patrice Gaborit, and Mathieu Dizin from Actilait for their technical assistance, Harriet Coleman for proofreading of our English, and the Quantitative Risk Assessment team CNIEL/Actilait for the statistical analysis.

This work was funded by the CNIEL through a thesis grant and financial support.

REFERENCES

- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142–201.
- Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11:450–479.
- Baylis CL. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Int. J. Dairy Technol. 62: 293–307.
- Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, Bouvet P, Haeghebaert S, Filliol I, Loirat C, Decludt B, Minh NNT, Vaillant V, de Valk H. 2008. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. Pediatr. Infect. Dis. J. 27:595–601.
- Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Infect. Dis. 43:1587–1595.
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet. Microbiol. 140:360–370.
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One 6:e22751. doi:10.1371/journal.pone.0022751.
- Pearce MC, Evans J, McKendrick IJ, Smith AW, Knight HI, Mellor DJ, Woolhouse MEJ, Gunn GJ, Low JC. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. Appl. Environ. Microbiol. 72:653–659.
- Riley LW, Remis RS, Helgeson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681–685.
- Lin A, Sultan O, Lau HK, Wong E, Hartman G, Lauzon CR. 2011. O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. Food Microbiol. 28:478–483.
- Chapman PA, Cerdán Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA. 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.
- Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriott DE, Carpenter LV. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. Prev. Vet. Med. 35:11–19.
- Sarimehmetoglu B, Aksoy MH, Ayaz ND, Ayaz Y, Kuplulu O, Kaplan YZ. 2009. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. Food Control 20:357–361.
- Ateba CN, Mbewe M. 2011. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. Res. Microbiol. 162:240–248.
- La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Wales AD. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. FEMS Microbiol. Rev. 33:394–410.
- Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussié S, Verstraete K, Cerf O. 14 August 2012. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int. J. Food Microbiol. [Epub ahead of print.] <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>.
- Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. J. Dairy Sci. 91:2561–2565.
- Vernozy-Rozand C, Montet MP, Berardin M, Bavai C, Beutin L. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. Lett. Appl. Microbiol. 41:235–241.
- Little CL, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, Grant K, McLaughlin J. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol. 25:304–312.
- Denny J, Bhat M, Eckmann K. 2008. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. Foodborne Pathog. Dis. 5:321–328.
- Espié E, Vaillant V, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Martin-Schaller R, De Valk H, Vernozy-Rozand C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiol. Infect. 134: 143–146.
- Honish L, Predy G, Hislop N, Chui L, Kowalewska-Grochowska K, Trottier L, Kreplin C, Zazulak I. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. Can. J. Public Health 96:182–184.
- D'Amico DJ, Druart MJ, Donnelly CW. 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd cheddar cheeses manufactured from raw milk. J. Food Prot. 73:2217–2224.
- Schlesser JE, Gerdes R, Ravishankar S, Madsen K, Mowbray J, Teo AYL. 2006. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. J. Food Prot. 69:990–998.
- Govaris A, Papageorgiou DK, Papatheodorou K. 2002. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of feta and teleme cheeses. J. Food Prot. 65:609–615.
- Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG, Samelis J. 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 degrees C. Food Microbiol. 23:268–276.
- Leuschner RGK, Boughtflower MP. 2002. Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. J. Food Prot. 65:508–514.
- Maher MM, Jordan KN, Upton ME, Coffey A. 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. J. Appl. Microbiol. 90: 201–207.
- Reitsma CJ, Henning DR. 1996. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. J. Food Prot. 59:460–464.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. Mol. Cell. Probes 18:185–192.
- Madic J, Peytavin de Garam C, Vingadassalon N, Oswald E, Fach P, Jamet E, Auvray F. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. J. Appl. Microbiol. 109:1696–1705.
- Nielsen EM, Andersen MT. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41:2884–2893.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. 98:1162–1168.
- Miszczycza SD, Ganet S, Dunière L, Rozand C, Loukiadis E, Thevenot-Sergentet D. 2012. Novel real time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat. J. Food Prot. 75:1373–1381.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J. Clin. Microbiol. 41:4930–4940.

36. DGAL. 2010. Bilan 2009 des plans de surveillance et de controle mis en oeuvre par la DGAL. Plan de surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC (VTEC) des viandes hachées et des fromages au lait cru pour l'année 2009, p 51–53. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoir, Paris, France.
37. Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Pihier N, Vaillant V, Francart S, Capek I, De Valk H. 2006. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France, 2005. In Sofronidis J (ed), Abstr. 6th Int. Symp. Shigatoxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne, Australia. Cambridge Publishing, West Leederville, WA, Australia.
38. Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL. 1983. L'elaboration d'un fromage: l'exemple du camembert. Pour la Science 69:30–42.
39. Eck A, Gillis J-C. 1997. Le fromage, 3rd ed. Tec & Doc Lavoisier, Paris, France.
40. Luquet FM. 1985. Laits et produits laitiers—vache, brebis, chevre. Tec & Doc Lavoisier, Paris, France.
41. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. 2008. Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. FEMS Microbiol. Lett. 282:124–131.
42. Savoye F, Rozand C, Bouvier M, Gleizal A, Thevenot D. 2011. Optimized enrichment for the detection of *Escherichia coli* O26 in French raw milk cheeses. Lett. Appl. Microbiol. 52:603–609.
43. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. 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.
44. Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Montet MP, Bonin V, Dernburg A, Richard Y. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. Int. J. Food Microbiol. 105:83–88.
45. Mahaut M, Jeantet R, Brulé G. 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier, Paris, France.
46. ICMSF. 1996. Microbiological specifications of food pathogens. In Microorganisms in foods, vol 5. Blackie Academic and Professional Publisher, Springer, London, United Kingdom.
47. Juneja VK, Marmer BS. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7:D— and z-value determinations in turkey, lamb and pork. Food Res. Int. 32: 23–28.
48. Enache E, Mathusa EC, Elliott PH, Black DG, Chen Y, Scott VN, Schaffner DW. 2011. Thermal resistance parameters for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in apple juice. J. Food Prot. 74:1231–1237.
49. Hassan AN, Frank JF. 2000. Heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. Egypt. J. Dairy Sci. 28:129–137.
50. Peng S, Tasara T, Hummerjohann J, Stephan R. 2011. An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. J. Food Prot. 74:849–864.
51. Usajewicz I, Nalepa B. 2006. Survival of *Escherichia coli* O157 in milk exposed to high temperatures and high pressure. Food Technol. Biotechnol. 44:33–39.
52. Sperber WH. 1983. Influence of water activity on foodborne bacteria—a review. J. Food Prot. 46:142–145.
53. Glass KA, Kaufman KM, Johnson EA. 1998. Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30 degrees C. J. Food Prot. 61:290–294.
54. Moretro T, Heir E, Mo KR, Habimana O, Abdelgani A, Langsrud S. 2010. Factors affecting survival of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. Int. J. Food Microbiol. 138:71–77.
55. Ramsaran H, Chen J, Brunke B, Hill A, Griffiths MW. 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. J. Dairy Sci. 81:1810–1817.
56. Erickson MC, Doyle MP. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Food Prot. 70:2426–2449.
57. Monday SR, Whittam TS, Feng PC. 2001. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 184:918–921.
58. Imamovic L, Muniesa M. 2012. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. PLoS One 7:e32393. doi:10.1371/journal.pone.0032393.
59. Schmidt H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. Res. Microbiol. 152:687–695.
60. Schwartzman MS, Maffre A, Tenenhaus-Aziza F, Sanaa M, Butler F, Jordan K. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. Int. J. Food Microbiol. 145(Suppl. 1):S31–S38.
61. Duffy G, Whiting RC, Sheridan JJ. 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiol. 16:299–307.
62. Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Jakobsen M. 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. Int. J. Food Microbiol. 153:192–202.
63. Lee K-I, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Kumagai S. 2012. *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* enhance the growth and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 under mild acidic conditions. J. Food Sci. 77:M102–M107.

Annexe 6 - Communications orales.

Une présentation orale à la journée thématique sur les STEC organisée par le CNIEL à Paris a été faite en Novembre 2011 ainsi que dans le cadre de la journée des doctorants organisée par VetAgro-Sup en mai 2012 :

Etude de la croissance, de la survie et de la pathogénicité des STEC dans les technologies fromagères au lait cru.

ETUDE DE LA CROISSANCE, DE LA SURVIE ET DE LA PATHOGENICITE DES STEC DANS LES TECHNOLOGIES FROMAGERES AU LAIT CRU.

MISZCZYCHA S.D. ; PERRIN F. ; GANET S. ; JAMET E. ; TENENHAUS-AZIZA F. ; FARROKH C. ; MONTEL M-C. ; THEVENOT-SERGENTET D.

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) peuvent être responsables d'épidémies alimentaires. Ils sont notamment responsables de troubles gastro-intestinaux tels que des diarrhées aqueuses voire hémorragiques. Malheureusement, dans certains cas, des complications peuvent survenir sous forme de syndromes hémolytiques et urémique (SHU) et entraîner la mort. Le réservoir des STEC est constitué par les bovins (et autres ruminants) qui sont porteurs sains. La contamination du lait par ces bactéries est la conséquence d'une mauvaise hygiène lors de la traite. Des études ont montré que les STEC sont présents dans les produits laitiers ; or de nombreux paramètres durant la fabrication fromagère et l'affinage peuvent influencer la croissance et la survie des STEC dans ces produits. L'objectif de ce travail était d'observer la croissance et la survie de souches STEC inoculées expérimentalement au cours de différentes fabrications fromagères.

Pour cela, 4 différentes technologies fromagères ont été testées : 2 pâtes pressées non cuites (PPNC), une pâte pressée cuite (PPC), une pâte persillée (PP) et une lactique chèvre (LC). Différentes souches provenant de 4 différents sérotypes de STEC (O157:H7, O26:H11, O103:H2 et O145:H28) ont été expérimentalement inoculées séparément dans du lait cru avant la fabrication fromagère à un taux de 10^2 UFC/mL. Leur croissance et survie ont été mesurées tout au long de la fabrication et de l'affinage.

Deux comportements ont été observés : soit une croissance en début de fabrication, soit une absence de croissance.

Pour les 2 PPNC et la PP, une augmentation du taux de STEC a été constatée lors des 24 premières heures de fabrication des fromages. Au cours de l'affinage, le taux de STEC a chuté pour les technologies PPNC et PP affinées 7 et 4 mois respectivement. Seuls certains sérotypes sont restés détectables uniquement après enrichissement. Pour la PPNC affinée moins d'un mois, le taux de STEC est resté quant à lui constant.

Pour les technologies PPC et LC, aucune croissance des STEC n'a été observée lors des premières heures de la fabrication. Ce phénomène peut être expliqué d'une part par l'étape de chauffage pour la technologie PPC et la longue phase d'acidification pour la technologie LC. Seuls certains sérotypes de STEC sont restés détectables après enrichissement en toute fin de fabrication.

Les analyses statistiques ont montré que toutes les souches d'un même sérotype se comportent de manière similaire tandis qu'un effet sérotype est observé pour toutes les technologies hormis pour la technologie PPC.

Ce projet a permis d'acquérir une meilleure connaissance du devenir des STEC dans différentes technologies de fromages au lait cru et a permis de mettre en relief l'impact de certains facteurs de fabrication tels que la durée de l'affinage, le chauffage ou la phase d'acidification longue sur la croissance et la survie des STEC.

Annexe 7 – Poster 1.

Présentation d'un poster au séminaire international : **Microbiological safety of UK raw milk cheeses** , au Campden BRI le 08 Mars 2011 (Chipping Campden, UK.) :

Growth, Survey and Pathogenicity of the STEC in French Raw Milk Cheeses.

S. D. Mischczycha, S. Ganet, E. Jamet, C. Farrokh, M.C. Montel and D. Thevenot-Sergentet.

Ce même poster a été présenté en Avril 2011 aux journées de l'école Doctorale de
Clermont-Ferrand.



Growth, Survey and Pathogenicity of the STEC in French Raw Milk Cheeses.



S. D. Miszczycha¹, S. Ganet¹, E. Jamet², C. Farrokh³, M.C. Montel⁴ and D. Thevenot-Sergentet¹

¹: CALITYSS – EMSA – LMAP/LNR STEC – VetAgro Sup, campus Vétérinaire de Lyon, 1 av. Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile, France.

²: Actilait, 419 route des champs laitiers, 74801 La Roche-sur-Foron, France.

³: CNIEL, 42 rue de Châteaudun, 75314 Paris, France.

⁴: URF – INRA UR545, 20 côte de Reyne, 15000 Aurillac, France.

^{*}: Corresponding author: s.miszczycha@vetagro-sup.fr



INTRODUCTION

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important cause of several human illness outbreaks. They're responsible of gastrointestinal diseases such as diarrhea, hemorrhagic colitis (HC). In some dramatic cases, STEC can cause hemolytic-uremic syndrome (HUS) and death.

STEC are part of the normal intestinal flora of lactating animals. Excretion of these bacteria in feces, which may then contaminate milk for processing, is not preventable. Once milk has been contaminated with STEC, they can subsequently grow in milk products produced from this contaminated milk. It is the reason that STEC have been detected in meat and dairy products. But public health importance of STEC presence in milk and dairy products remains unclear. In fact, the behaviour of STEC in raw milk cheeses is unknown; many parameters in cheese manufacturing and ripening processes could influence growth and survival of these bacteria in such products. Consequently understanding STEC behavior in cheeses would help to evaluate risk for human health.

The aim of our study was to observe the growth and survival of experimentally inoculated STEC strains during cheese production and to combine STEC growth with microbiological and physico-chemical parameters which are measured during the experiment.

Strains used for the Challenge tests

Strain name	Genotype	STX2a	STX2b
L23A (cow milk cheese)	F15338	+	+
F73120 (cow milk cheese)	F73120	+	+
F12983a (cow milk cheese)	F12983a	+	+
F12983b (cow milk cheese)	F12983b	+	+
F12983c (cow milk cheese)	F12983c	+	+
F12983d (cow milk cheese)	F12983d	+	+
F12983e (cow milk cheese)	F12983e	+	+
F12983f (cow milk cheese)	F12983f	+	+
F12983g (cow milk cheese)	F12983g	+	+
F12983h (cow milk cheese)	F12983h	+	+
F12983i (cow milk cheese)	F12983i	+	+
F12983j (cow milk cheese)	F12983j	+	+
F12983k (cow milk cheese)	F12983k	+	+
F12983l (cow milk cheese)	F12983l	+	+
F12983m (cow milk cheese)	F12983m	+	+
F12983n (cow milk cheese)	F12983n	+	+
F12983o (cow milk cheese)	F12983o	+	+
F12983p (cow milk cheese)	F12983p	+	+
F12983q (cow milk cheese)	F12983q	+	+
F12983r (cow milk cheese)	F12983r	+	+
F12983s (cow milk cheese)	F12983s	+	+
F12983t (cow milk cheese)	F12983t	+	+
F12983u (cow milk cheese)	F12983u	+	+
F12983v (cow milk cheese)	F12983v	+	+
F12983w (cow milk cheese)	F12983w	+	+
F12983x (cow milk cheese)	F12983x	+	+
F12983y (cow milk cheese)	F12983y	+	+
F12983z (cow milk cheese)	F12983z	+	+

Inoculum preparation:

- Cold adaptation of the strains (48h at +8°C).
- In order to simulate storage condition of milk.
- Inoculation rate: 10⁷ CFU/ml in raw milk.

Sampling at the different stages of the manufacture.



Cheeses making:



→ All the cheeses fabrications were done at the Unité de Recherche Fromagère de the INRA of Aurillac by 2 teams :



Semi Hard Cheese (long ripening step – cow milk):

- 2 strains tested in triplicate: L23A and 721.4.
- 240 days of manufacture.
- 30 samples tested.

Semi Hard Cheese (short ripening step – cow milk):

- 8 strains tested in triplicate: 7501A, L23A, F15338, F73120, F12983a, F324, 721.4 and 6222-16.3.
- 40 days of manufacture.
- 600 samples tested.

Blue Mould Cheese (sheep milk):

- 3 strains tested in triplicate: L23A, F12983a, 721.4.
- 240 days of manufacture.
- 72 samples tested.

Hard Cheese (cow milk):

- 3 strains tested in duplicate: L23A, F12983a, 721.4.
- 120 days of manufacture.
- 126 samples tested.

Lactic Goat Cheese (goat milk):

- 8 strains tested in triplicate: 7501A, L23A, F15338, F73120, F12983a, F324, 721.4 and 6222-16.3.
- 60 days of manufacture.
- 240 samples tested.

Enumeration of STEC:



- Five-fold dilution in Buffer Pepton Water.
- Grinding and homogenization.
- Dilution and plating on specific agar.



Enumeration

If negative

Enrichment

Detection

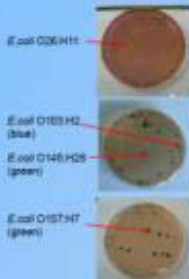
Enumeration of STEC were done at CALITYSS – EMSA – VetAgro Sup.



- After taking sample for enumeration, addition of Acriflavin and incubation 24H at 41.5°C or 37°C.

- Research of strains by immunoenrichment methods (VIDAS and/or IMS).

- Confirmation of the serotype by RT-PCR¹.



- E.coli O26:H11 : + ROD5 + agar¹
- Biorad agglutination test for O26 / RT-PCR¹
- ¹: B. Pezeta et al 2004.
- E.coli O103:H2 and O145:H28 : + Bjorn Possé + agar²
- ²: B. Possé et al 2008.
- RT-PCR³
- E.coli O157:H7, O157:ID CT agar (bioMérieux)
- Oxid agglutination test for O157 / RT-PCR¹

Perspective:

Challenges tests and statistical analysis are in progress. This project will permit a better understanding of the behavior of STEC in raw milk cheeses and to define parameters that could inhibit or reduce the growth.

Acknowledgement:

This work has been made by a grant given by the Centre National de l'Interprofession et de l'Economie Laitière.



Annexe 8 - Poster 2.

Mes travaux ont donné lieu à la présentation d'un poster au séminaire international **VTEC 2012** à Amsterdam en mai 2012 :

Growth, Survival and Pathogenicity of the STEC in French Raw Milk Cheeses.

S. D. Mischczycha, F. Perrin, S. Ganet, F. Tenenhaus-Aziza, E. Jamet, C. Farrokh, M.C. Montel and D. Thevenot-Sergentet.



INTRODUCTION

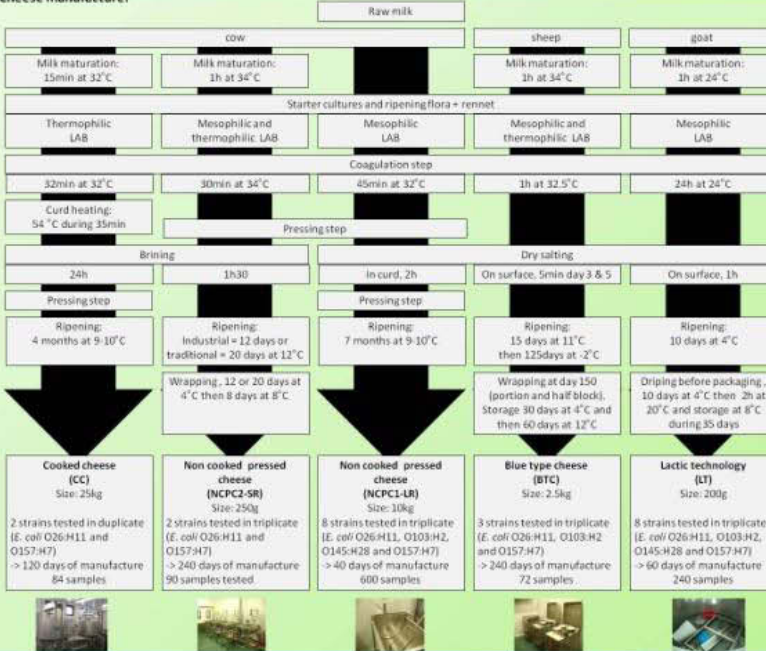
Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important cause of several human illness outbreaks. They're responsible of gastrointestinal diseases such as diarrhea, hemorrhagic colitis. In some dramatic cases, STEC can cause hemolytic-uremic syndrome and death. Investigations have demonstrated that forces of cattle are considered to be the main source of STEC contamination of milk and then cheeses. The behaviour of different serotypes of STEC in raw milk cheeses is unknown: many parameters in cheese manufacturing and ripening processes could influence their growth and survival.

The aim of this study was to evaluate the behavior of different STEC serotypes during the manufacturing, ripening and storage of cheeses prepared according to the main five types of technologies in link with their physico-chemical characteristics.

OBJECTIVE

MATERIALS AND METHODS

Cheese manufacture:



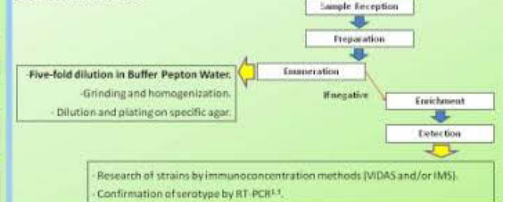
Strains used and inoculum preparation:

Host (origin)	Serotype	Virulence genes
PS1A (cow milk cheese)	O26:H11	eae, stx2
L23A (sheep milk)	O26:H11	eae, stx2
F1530 (cow milk cheese)	O26:H11	eae, stx2
F7312 (cow milk cheese)	O103:H2	eae, stx2
312994 (sheep milk)	O103:H2	eae, stx2
F124 (cow milk cheese)	O145:H28	eae, stx2
7214 (sheep milk)	O157:H7	eae, stx2
6222-10.3 (goat milk cheese)	O157:H7	eae, stx2

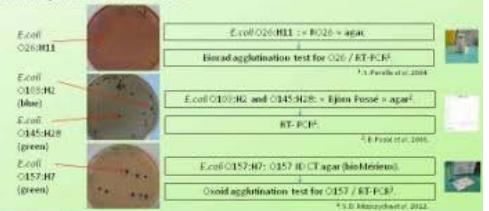
All strains were cold adapted (48h at +8°C) to simulate storage condition of milk.

Inoculation rate: 10⁷ CFU.mL⁻¹ in raw milk.

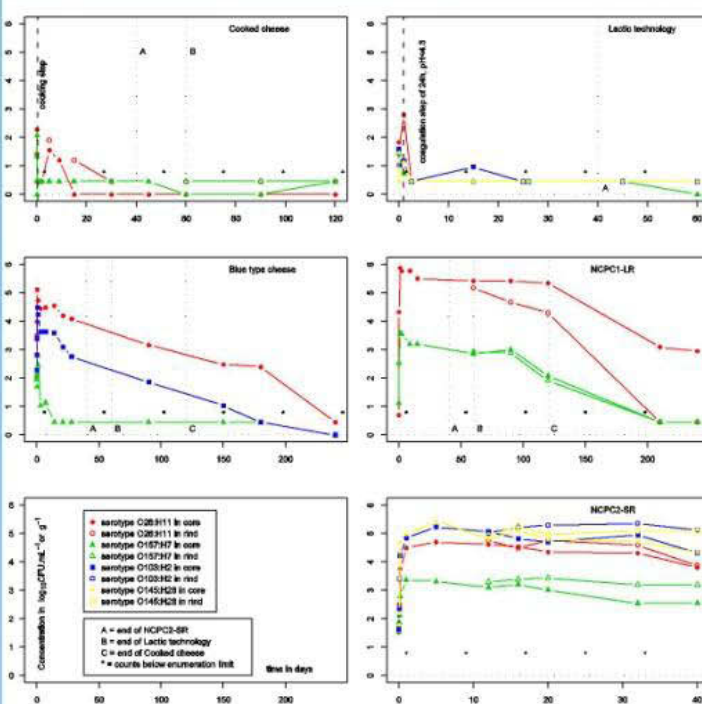
Enumeration of STEC:



Isolation/confirmation of STEC:



RESULTS and DISCUSSION



STEC behavior in the different types of cheeses:

Three behaviors of the STEC were observed in the core or in the rind according to cheese technology.

- No increase of the STEC rate during the first step of cheeses manufacture:**
 → For the cooked cheese (CC) technology: curd cooking (>50°C) may be lethal of the STEC.
 → For the lactic technology (LT): pH decreased gradually to reach 4.22 after 24h. This could prevent STEC growth.
- Increase of the STEC rate during the first step of cheeses manufacture / decrease during ripening.**
 → For the blue type cheese (BTC).
 → For the non cooked pressed cheese type 1 (NCP1-LR).
 The long ripening step of these cheeses with an important decrease of a_w may contribute to the decrease of STEC rate.
- Increase of the STEC rate during the first step of cheeses manufacture / no decrease during ripening.**
 → For the non cooked pressed cheese type 2 (NCP2-SR): ripening lasts less than 20 days without change in a_w and pH.

Serotype effect:

Statistically, no strain effect was observable in our experiments but a serotype effect has been demonstrated. We hypothesize that serotypes O26:H11, O103:H2 and O145:H28 may be better competitors than serotype O157:H7.

CONCLUSION

These results clearly show that, in some technologies, the level of STEC increased during the first 24 hours of the cheese making. In cheese with long ripening, STEC decreased during this step and storage even if most of the strains remained detectable after enrichment. Several hurdles (pH, decrease of a_w, microbial metabolism) may contribute to this decrease but their contribution remains to be clarified. It will be necessary to validate our results by inoculating other strains of these serotypes of STEC at lower level (<10 CFU.mL⁻¹, close to natural contamination). Further studies should focus on STEC virulence after their development in cheeses.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by the CNIEL through a thesis grant and financial support.

Annexe 9 – Publication 3.

Survival of *E. coli* O26:H11 exceeds that of *E. coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses.

Stéphane D. Miszczycha, Jonathan Thévenot, Sylvain Denis, Cécile Callon, Valérie Livrelli, Monique Alric, Marie-Christine Montel, Stéphanie Blanquet-Diot, Delphine Thevenot-Sergentet

Cet article a été soumis à la revue à comité de lecture **Applied and Environmental Microbiology**.

2 **Survival of *E. coli* O26:H11 exceeds that of *E. coli* O157:H7 as assessed by simulated human**
3 **digestion of contaminated raw milk cheeses.**

4 Stéphane D. Mischczycha,^{1,2,§} Jonathan Thévenot,^{3,4,§} Sylvain Denis,³ Cécile Callon,⁵ Valérie
5 Livrelli,^{4,6} Monique Alric,³ Marie-Christine Montel,⁵ Stéphanie Blanquet-Diot,³ Delphine
6 Thevenot-Sergentet^{1,7*}

7

8 1. Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Unité de recherche
9 CALITYSS, F-63280 MARCY L'ETOILE

10 2. CNIEL, F-75314 PARIS

11 3. Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine
12 Auvergne, EA 4678 CIDAM, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

13 4. Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine
14 Auvergne, M2iSH, UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, BP 10448, F-
15 63000 CLERMONT-FERRAND

16 5. INRA, UR 545, Recherches fromagères, F-15000 AURILLAC

17 6. CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, F-63003 CLERMONT-FERRAND

18 7. LMAP-NRL STEC, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, F-63280 MARCY L'ETOILE

19 § These authors contributed equally to this manuscript.

20

21 * Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de
22 recherché CALITYSS, 63280 Marcy l'étoile, France. Phone: (33) 478 87 25 99. Fax: (33) 478 87
23 25 51. E-mail: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33 **Abstract**

34 Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important cause of several human illness
35 outbreaks. The consumption of dairy products may represent an important route of STEC
36 infection. For successful food borne transmission, STEC strains must survive stress conditions
37 found during gastrointestinal transit in human. The aim of this study was to evaluate the
38 survival of two STEC strains of serotypes O157:H7 and O26:H11 during simulated human
39 digestion in the TNO gastro-Intestinal tract Model (TIM) of contaminated uncooked pressed
40 cheeses. The survival of cheese microflora during *in vitro* gastrointestinal transit was also
41 determined for the first time. During transit through the artificial stomach and duodenum,
42 level of STEC decreased whereas bacterial resumption was observed in the jejunum and
43 ileum. The fate of STEC was strain dependant, the survival of *E. coli* O26:H11 being 13 times
44 superior to that of *E. coli* O157:H7 at the end of digestion. The lower resistance of *E. coli*
45 O157:H7 to gastric conditions and its subsequent lower capability to grow in the distal small
46 intestine may result from a deficiency in the glutamate decarboxylase (GAD) system. These
47 findings suggest that a large number of strains should be tested in order to draw relevant
48 conclusions about the pathogen survival.

49 Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an important emerging group of
50 foodborne pathogens. STEC are characterized by the production of cytotoxins named Shiga
51 toxins (encoded by the genes *stx1*, *stx2*) (1). Pathogenic STEC (also called enterohemorrhagic
52 *E. coli* or EHEC) are a cause of food poisoning outbreaks in humans. They can be responsible
53 for a variety of clinical outcomes ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis and in some
54 severe cases, they can cause hemolytic-uremic syndrome and even death (1, 2). EHEC are
55 transmitted via a variety of food vehicles, including ground beef, vegetables and dairy
56 products (3–5). The presence of the virulence genes or STEC strains has been found in raw
57 milk and raw milk cheeses (5). *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O26:H11 are the most often
58 implicated *E. coli* serotypes in outbreaks of STEC illness from dairy products (5–7). A raw milk
59 white-mould rinded soft cheese contaminated by *E. coli* O26:H11 was implicated in an
60 outbreak in France in 2005 (7). For successful food borne transmission, EHEC strains must
61 survive harsh conditions found during food processing and gastrointestinal transit in human.
62 Several studies were dedicated to the investigation of STEC behavior during the manufacture
63 and ripening of cheeses (5). In particular, in a previous study (8), we demonstrated that
64 various STEC serotypes, particularly *E. coli* O157:H7 and O26:H11 strains, are able to survive
65 during cheese manufacturing in different cheese technologies.

66 Hitherto, no study has monitored the behavior of STEC during human digestion of raw
67 milk cheeses contaminated by the pathogen. During digestion, gastric pH, gastrointestinal
68 secretions and peristalsis are important factors controlling the outcome of food-borne
69 pathogens. The TNO gastro-Intestinal tract Model (TIM) is the dynamic multi-compartmental
70 *in vitro* system which presently allows the closest simulation of *in vivo* physiological
71 processes occurring within the lumen of the stomach and small intestine in human (9, 10).
72 The main parameters of digestion, such as pH, body temperature, peristaltic mixing and
73 transport, gastric, biliary and pancreatic secretions, and passive absorption of small
74 molecules and water are reproduced as accurately as possible.

75 In this study, we used the TIM system to evaluate the survival of serotypes O157:H7
76 and O26:H11 during simulated human digestion of uncooked pressed cheeses prepared with
77 cow raw milk and contaminated with the strains. In addition, we determined for the first
78 time the survival of cheese microflora during *in vitro* gastrointestinal transit. The behavior of

79 STEC strains and cheese microflora during cheese manufacturing and ripening was also
80 studied.

81

82 **Material and methods**

83

84 **Bacterial strains.** Two different strains isolated from contaminated cheeses and
85 obtained from the French National Laboratory Reference of STEC were used in the present
86 study: *E. coli* O26:H11 strain F15338A and *E. coli* O157:H7 strain 721.4. Presence of the
87 major genes implicated in bacterial virulence (genes *eae* and *stx*) and acido-resistance (*rpoS*,
88 *gadA/B*, *gadC* and *gadE*) has been tested by PCR as previously described (11–15). In
89 addition, the strains were tested for their ability to survive acid stress by using the
90 glutamate-dependent system according to the protocol described by Rice et al. (16) and
91 modified by Takada et al. (13): the decarboxylation of glutamate by the glutamate
92 decarboxylase (GAD) led to an increase in pH of the GAD reagent causing the indicator color
93 (bromocresol green) to change from yellow to green.

94 All strains were revived from frozen vials at -80°C by growing 24 h at 37°C in BHI (Brain
95 Heart Infusion, bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). A 1:100 (v/v) dilution was made in BPW
96 (Bacton Pepton Water, bioMerieux, Marcy l’Etoile, France), incubated at 37°C for 24 h and
97 stored at 8°C for 48 h to simulate the storage conditions of milk and cold-adapt the strains.
98 The cold-adapted inocula were diluted before use in cheese making.

99

100 **Manufacture and ripening of cheese**

101 **Cheese making.** Two cheese-making experiments (Fig. 1) were realized at two weeks
102 interval with artificial inoculation of either *E. coli* O26:H11 strain F15338A (experiment A) or
103 *E. coli* O157:H7 strain 721.4 (experiment B).

104 For each experiment, raw milk was collected from a local producer and transferred to the
105 experimental cheese plant (INRA, Unité de Recherches Fromagères, UR545, Aurillac, France)
106 under refrigerated conditions. For each trial, the absence of *E. coli* O26:H11 or *E. coli*
107 O157:H7 was checked. Raw milk was divided in 3 vats containing 20 liters of milk each and
108 then warmed to 34 °C. All vats of raw milk were added with CaCl₂ (3 ml/20 l) and inoculated
109 with independent cultures of each STEC strain at 500 CFU/ml of milk. Starter cultures

110 containing 1 % thermophilic bacteria Y 502 and 0.1 % mesophilic bacteria SIR, one strain of
111 *D. hansenii* (0.3 ml/20 l) and one strain of *Geotrichum candidum* (0.3 ml/20 l) were added.
112 Then rennet was added at 30 ml/100 l. Four cheeses of 500 g were manufactured from each
113 vat according to an uncooked pressed cheese type technology with a short ripening step as
114 previously described (8, 17, 18). Three cheeses were used for physico-chemical analyses and
115 enumeration of STEC and cheese microflora (cheese making, aging up to 20 days and storage
116 until 35 days). One cheese was used to investigate microorganisms' survival during artificial
117 digestion in the TIM system.

118 **Physico-chemical analysis.** The pH was regularly determined during cheese
119 manufacturing using a 926 VTV pH meter with an Ingold 406 MX penetration electrode
120 (Mettler-Toledo, Viroflay, France). The a_w values were measured at day 35 by a LabMaster-
121 aw (Novasina, Lachen, Switzerland).

122 **Sampling.** Samples for enumerating STEC strains and cheese microflora were taken
123 from milk and cheeses in cores at different stages of cheese making, ripening and storage
124 (prior and after the maturation of milk and on days 1, 7, 14, 20 and 35).

125

126 **Artificial digestions**

127 **Gastro-intestinal system.** All the artificial digestions were performed at the EA CIDAM
128 (Clermont-Ferrand, France). The gastro-intestinal system TIM (TNO, Zeist, The Netherlands)
129 consists of four successive compartments simulating the conditions found in the stomach
130 and the three segments of the small intestine in human, the duodenum, jejunum, and ileum.
131 This system has been already described elsewhere (9, 10). Briefly, each compartment is
132 composed of glass units with a flexible inside membrane. Peristaltic mixing and body
133 temperature are achieved by pumping water at 37°C into the space between the glass jacket
134 and the flexible wall at regular intervals. Mathematical modelling of gastric and ileal
135 deliveries with power exponential equation (19) is used for the computer control of chyme
136 transit. Chyme transport through the TIM is regulated by the peristaltic valves that connect
137 the successive compartments. The volume in each compartment is monitored by a pressure
138 sensor and pH is computer-monitored and continuously controlled by adding either HCl or
139 NaHCO₃. Simulated gastric, biliary and pancreatic secretions are introduced into the
140 corresponding compartments by computer-controlled pumps. Water and products of

141 digestion are removed from the jejunal and ileal compartments by pumping dialysis liquid
142 through hollow fiber membranes (SF 90G, Nipro[®], Belgium). Before each experiment, the
143 system is washed with detergent, rinsed with water and decontaminated by steaming at 105
144 °C for 45 min.

145 **TIM parameters.** The TIM system was programmed to reproduce, according to *in vivo*
146 data, the digestion of a solid meal in a healthy human adult (Table 1). The suspension (300
147 ml) consisted of equal weight of cheese and mineral water (Volvic[®], France), homogenized 1
148 min with an Ultra Turrax system (T25, IKA[®]-Werke, Germany) set at 24,000 rpm. All the
149 cheese suspensions were prepared extemporaneously and subjected to digestion during 360
150 min. Two series of digestions were performed: (A) uncooked pressed cheese experimentally
151 contaminated with *E. coli* O26:H11 strain F15338A (*n* = 3) and (B) uncooked pressed cheese
152 experimentally contaminated with *E. coli* O157:H7 strain 721.4 (*n* = 3). During digestion, the
153 ileal deliveries were kept on ice and pooled hour-by-hour. To evaluate the microorganism
154 survival rate throughout digestion, control experiments were carried out using the same
155 experimental protocol (*n* = 3 with solid meal parameters) with water containing 0.8 % (w/v)
156 of a non-absorbable water-soluble marker, blue dextran (9).

157 **Sampling.** Samples were taken from the cheese suspensions prior to introduction into
158 the artificial stomach for STEC and cheese microflora enumeration. Samples were regularly
159 collected during digestion from each compartment (stomach, duodenum, jejunum and
160 ileum) and ileal deliveries of the TIM system for STEC and/or cheese microflora counting.

161 **Blue dextran analysis.** Blue dextran (used as a transit marker) concentrations in the
162 digestive samples from the TIM system were determined colorimetrically using a
163 spectrophotometer (DU[®] 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter, France) at a
164 wavelength of 595 nm.

165

166 **Microbial counting**

167 **STEC strains.** Milk, cheese and digestive samples were diluted (respectively 1:5, 1:5,
168 1:10 v/v) in sterile BPW. Cheese samples were homogenized 60 s in a stomacher (AES, Bruz,
169 France). Further decimal dilutions were performed with sterile TS (Tryptone Salt,
170 bioMérieux) and spread onto selective agar for O157:H7 and O26:H11 strains (Table 2). All
171 enumerations were performed in triplicate.

172 When a STEC strain could not be enumerated in a sample, an enrichment step was
173 performed. The remaining enrichment broth (complemented with acriflavin for cheese
174 samples) was incubated for 24 h at 41.5°C for serogroups O26 and O157 (8).
175 Immunomagnetic separation (IMS) using beads coated with specific antibodies against the
176 serogroup of the target strain was performed with Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise,
177 France), according to the manufacturer's instructions. The resulting IMS solutions were
178 plated onto selective differential agar media (Table 2).

179 After 24 h incubation at 37°C, all presumptive colonies (obtained without or with the
180 enrichment step) were tested with Real Time PCR as described below.

181 **Cheese microflora.** Milk and cheese samples were mixed in sterile phosphate buffer
182 2% (w/v) and blended with a Stomacher Lab Blender (Seward Medical, London, UK) for 4
183 min. Digestive samples were diluted (1:10 v/v) in sterile BPW. Further decimal dilutions were
184 performed with sterile TS. All counts were performed in triplicate. Mesophilic and
185 thermophilic bacterial populations, facultatively heterofermentative *Lactobacilli*, Dextrane
186 producing *Leuconostoc*, Dextran negative lactic acid bacteria, Enterococci, Gram-positive
187 catalase⁺ bacteria (ripening bacteria), Gram negative bacteria and yeasts and moulds were
188 enumerated on selected agar as described in Table 2. All media were purchased from Biokar
189 Diagnostics (Pantin, France).

190

191 **Confirmation of isolated STEC strains from cheese and digestive samples by Real-**
192 **Time PCR.** Total genomic DNA was extracted from a single colony by boiling in DNA/DNAse-
193 free water for 15 min followed by centrifugation (3 min at 13,000 g). The supernatant
194 containing the DNA was stored at -20°C until used. The confirmations of *E. coli* O157:H7, the
195 O-antigens of *E. coli* O26 and the flagellar H11 antigen gene were performed using the
196 protocols described by Miszczucha et al. (20), Perelle et al. (12) and Madic et al. (21),
197 respectively. Each reaction (30 µl) comprised 1X TaqMan gene expression Master Mix
198 (Applied Biosystems, Foster City, CA), primers and probes diluted according to authors'
199 instructions, 1X IPC Mix and IPC DNA (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents
200 – Applied Biosystems), molecular grade H₂O and 3 µl of template DNA. Thermal cycling and
201 detection were performed using a StepOne Plus (Applied Biosystems). The generation of
202 fluorescence for each sample was monitored at the end of each elongation step. A

203 fluorescent signal 10 times higher than the standard deviation of the mean baseline
204 emission was indicative of a positive detection. The CT was defined as the PCR cycle at which
205 fluorescent intensity rises above the baseline.

206

207 **Statistical analysis**

208 Results are given as means \pm standard deviation ($n = 3$). Regarding the experiments in the
209 TIM system, all the results were expressed as percentages of initial intake. Significant
210 differences between treatments were tested by analysis of variance (ANOVA) with repeated-
211 measure analysis followed by a *post hoc* test. Analyses were performed using SAS 9.1
212 Software (SAS 9.1 Software, Inc, Cary, NC). A probability level of $P < 0.05$ was taken to
213 indicate statistical difference.

214

215 **Results**

216

217 **Physico-chemical characteristics of cheeses.** For experiments A and B, cheese core pH
218 decreased from 6.7 to 5.2 during the first day and reached 5.1 at day 7 (Fig. 2). Then, pH
219 increased slowly and reached 5.2 ± 0.1 ($n = 3$) for the experiment A and 5.3 ± 0.1 ($n = 3$) for
220 the experiment B at day 35. The a_w values at day 35 in cheese cores were 0.96 for
221 experiments A and B.

222 **Microbial analysis of cheeses.** STEC and cheese microflora counts are shown in Figure
223 3 and Table 3, respectively. The levels of the *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 strains
224 increased during the first day of manufacturing to reach 4 to 5 \log_{10} CFU/g. During ripening,
225 concentrations of the two STEC strains remained constant around 4 \log_{10} CFU/g until day 20
226 (4.0 and 3.8 \log_{10} CFU/g, for experiment A and B, respectively).

227 The level of Enterococci increased to reach a peak of 6.8 ± 0.1 \log_{10} CFU/g at day 14 in
228 experiment A (cheeses inoculated with *E. coli* O26:H11) versus only 5.0 ± 0.6 \log_{10} CFU/g at
229 day 20 in experiment B (cheeses inoculated with *E. coli* O157:H7). Then, it remained
230 constant until day 35. For the other populations, the results obtained during the two
231 experiments are similar. The level of dextran negative lactic acid bacteria increased by 3
232 \log_{10} CFU/g during the first day of cheese manufacture and then remained stable until day
233 35. The level of dextran producing *Leuconostoc* and *Lactobacilli* increased regularly after 24

234 h to reach 7.1-7.4 and 8.4-8.7 log₁₀ CFU/g, respectively, at day 35. The levels of ripening,
235 mesophilic and thermophilic bacteria increased by 3 to 4 log₁₀ CFU/g during cheese
236 manufactures. The levels of yeasts increased the first week and remained constant
237 afterward around 6 log₁₀ CFU/g whereas that of mould increased during cheese manufacture
238 and ripening from 2 to 5 log₁₀ CFU/g. The concentrations of Gram negative bacteria
239 increased the first day from 4 to 6 log₁₀ CFU/g and then remained constant until 35 days.

240

241 **Survival of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal**
242 **conditions.** The viability during gastrointestinal transit through the TIM of *E. coli* O26:H11
243 and *E. coli* O157:H7 present in cheese suspensions was determined by cross-comparing the
244 result obtained for bacterial counting and blue dextran concentrations. The blue dextran is a
245 transit marker which is neither degraded nor absorbed during digestion and which would
246 correspond to a 100 % survival rate for bacteria. Its concentrations throughout the TIM
247 fluctuated according to the volume of each digestive compartment, the rate of dilution by
248 digestive secretions and the chyme flow between two successive compartments.

249 The survival percentages obtained for *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 in each
250 compartment of the TIM are presented in Figure 4. During its transit through the TIM
251 stomach (Fig. 4A), the survival of O157:H7 was affected since 60 min digestion as the
252 percentages obtained for bacteria were significantly lower than those of the transit marker
253 ($P < 0.001$). At 150 min, 0.2 ± 0.2 % ($n = 3$) of ingested *E. coli* O157:H7 was recovered versus
254 14.3 ± 0.3 % ($n = 3$) for the transit marker. In this compartment, the level of *E. coli* O26:H11
255 was also significantly reduced ($P < 0.05$), but from 90 min digestion. At 150 min, 1.8 ± 1.7 %
256 of *E. coli* O26:H11 was recovered versus 14.3 ± 0.3 % for the marker ($P < 0.001$, $n = 3$). In the
257 gastric compartment, the survival percentage of *E. coli* O26:H11 was significantly higher than
258 that of *E. coli* O157:H7 from 60 min digestion ($P < 0.05$).

259 In the duodenum (Fig. 4B), a significant decrease in O157:H7 level was observed from
260 120 min of digestion ($P < 0.01$), whereas the survival of O26:H11 was not affected since the
261 curve for the bacteria fitted that of the marker (except for 60 min). In the jejunum (Fig. 4C),
262 the curve for *E. coli* O157:H7 remained above that of the marker during the overall digestion,
263 even if the difference was no significant. The percentages obtained for *E. coli* O26:H11 were
264 significantly ($P < 0.05$) higher than that of the blue dextran, from 120 min to the end of

265 digestion, showing that growth resumption occurred in this compartment. At 360 min, the
266 percentages of bacterial cells largely exceeded that of the transit marker ($102.0 \pm 36.7 \%$
267 versus $2.1 \pm 0.4 \%$, $P < 0.001$, $n = 3$). In the ileum (Fig. 4D), a non-significant growth
268 resumption was observed at 360 min for *E. coli* O157:H7 ($35.8 \pm 20.4 \%$ for bacteria versus
269 $12.6 \pm 1.1 \%$ for the marker, $n = 3$). From 60 min digestion, significant growth resumption
270 was observed for *E. coli* O26:H11 ($P < 0.05$). At 360 min, recovery percentages of bacteria
271 were much higher than that of the transit marker ($663.2 \pm 493.1 \%$ versus $12.6 \pm 1.1 \%$, $P <$
272 0.01 , $n = 3$). In the small intestinal compartments, recovery percentages of *E. coli* O26:H11
273 were significantly higher than that of *E. coli* O157:H7 ($P < 0.05$).

274 The cumulative ileal delivery of viable bacterial cells is given in Figure 5. Even if they
275 were lower, the percentages obtained for *E. coli* O157:H7 were not significantly different
276 from that of the transit marker ($P > 0.05$). In contrast, the recovery of *E. coli* O26:H11 was
277 significantly higher than that of the marker from 300 min digestion ($P < 0.001$). At 360 min
278 digestion, the survival percentage of *E. coli* O26:H11 was 13 times higher than that of *E. coli*
279 O157:H7 ($443.9 \pm 131.3 \%$ versus $33.3 \pm 17.4 \%$, $P < 0.001$, $n = 3$). These results strengthen
280 those previously obtained in the small intestinal compartments of the TIM model (Fig. 4).

281

282 **Survival of cheese microflora in simulated gastro-intestinal conditions.** The
283 cumulative ileal deliveries of cheese microflora are given in Figure 6. In experiments A and B,
284 a significant loss of viability was observed for mesophilic and thermophilic bacterial flora,
285 ripening bacteria, dextran-negative lactic acid bacteria, and facultatively heterofermentative
286 Lactobacilli from 60 min digestion ($P < 0.01$). For all these populations, at 360 min digestion,
287 less than 30 % of ingested cells were recovered versus 85% for the transit marker. The
288 survival of dextran producing *Leuconostoc* was also significantly affected during *in vitro*
289 digestions, but from 180 min ($P < 0.05$). For yeasts and moulds, a significant loss of viability
290 was observed in both experiments, from 180 min and 300 min digestion, respectively ($P <$
291 0.05). At the end of digestion, recovery percentages of moulds were twice that of yeasts
292 (around 50 % versus 25 %). From 180 min, yeast survival rate measured in experiment B
293 (cheese inoculated with O157:H7) was significantly ($P < 0.05$) higher than that obtained in
294 experiment A (cheese inoculated with O26:H11). At 360 min digestion, $32.7 \pm 7.6 \%$ of
295 ingested yeasts were recovered in experiment B compared to $16.0 \pm 5.2 \%$ in experiment A

296 ($n = 3$). The curves obtained for Enterococci (except for 360 min in experiment A) and Gram-
297 negative bacteria fitted that of the transit marker, showing that bacterial survival was not
298 influenced by the digestion process ($P > 0.05$). At the end of digestion in experiment A, the
299 recovery percentage of Enterococci was significantly higher than that of the marker ($214.1 \pm$
300 101.5 % compared to 85.2 ± 1.2 %, $P < 0.05$), suggesting that growth resumption occurred
301 during *in vitro* digestion. Even if not significant, Gram-negative bacteria and Enterococci
302 survival percentages tend to be higher in experiment A compared to B.

303

304 **Acid resistance of STEC strains.** The major genes involved in acid resistance (*rpoS*,
305 *gadA/B*, *gadC* and *gadE*) have been detected by PCR in both *E. coli* O157:H7 strain 721.4 and
306 *E. coli* O26:H11 strain F15338A (Table 4). The results of GAD activity are also indicated in
307 Table 4. After 4 h incubation with *E. coli* O26:H11 strain, the decarboxylation of L-glutamic
308 acid led to an increase of pH and a change of color from yellow to green. Interestingly, when
309 incubated with *E. coli* O157:H7, the GAD reagent showed mixed color of green and yellow.

310

311 **Discussion**

312

313 There is a lack of information concerning the responses of O157:H7 and non-O157:H7
314 STEC strains during digestion by human. This study is the first report of the survival of
315 O157:H7 and O26:H11 STEC strains during artificial digestion of cheese suspensions. These
316 suspensions were experimental raw milk uncooked pressed cheeses prepared with milk
317 artificially contaminated with STEC.

318 Through making and ripening of these uncooked pressed cheeses, the fate of STEC
319 strains was similar to that previously described (8), with an increase in STEC levels during the
320 first hours followed by stability in cell concentrations during the ripening. Nevertheless, the
321 growth of *E. coli* O26:H11 was lower than expected (8). This may result from variations in
322 biochemical composition of milk, or/and quantitative or qualitative differences in
323 autochthonous raw milk microbiota (*Enterococci* ten-fold higher in experiment A, high rate
324 of Gram-negative bacteria). Inhibition or activation of STEC by native microflora has been
325 poorly described (22, 23).

326 To assess the survival of *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O26:H11 during simulated human
327 digestion, contaminated cheeses were submitted to digestion in the TIM system. A loss of
328 viability was observed during bacterial transit through the artificial stomach and duodenum,
329 whereas growth resumption of STEC strains was observed in the distal part of the small
330 intestine. In the stomach, the loss of viability could be the consequence of the synergic
331 effect of extremely acidic conditions and gastric secretions. The gastric juice is known to be
332 the first barrier against various infection diseases (24). The loss of viability of the STEC strains
333 (especially *E. coli* O157:H7) in the duodenum could be a consequence of the action of bile
334 salts as it has been hypothesized previously (25, 26). Pancreatic secretions also most
335 certainly play a role in STEC survival in the small intestine, but nothing is known about their
336 impact on the pathogen. A synergic effect of bile salts and pancreatic secretions against the
337 STEC cannot be excluded. The growth renewal observed in the jejunum and ileum (especially
338 for *E. coli* O26:H11) may result from the occurrence of less stringent conditions such as pH
339 values closer to neutrality and bile salts concentration lower than that found in the
340 duodenum. The results obtained in the present study for *E. coli* O157:H7 strain 721.4 are in
341 accordance with those previously found by Etienne-Mesmin et al. (25) during *in vitro*
342 digestion in the TIM system of a meal containing raw ground beef contaminated with *E. coli*
343 O157:H7 strain EDL 933. Interestingly, the survival percentages obtained for EDL 933 when
344 co-administrated with a probiotic yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* are similar to that
345 observed here for *E. coli* O157:H7 strain 721.4 when ingested within cheese matrix
346 containing the autochthonous raw milk microbiota (including yeasts).

347 In parallel to STEC strains, the behaviour of cheese microflora was evaluated for the
348 first time during simulated human digestion. Most of the populations studied were sensitive
349 to gastro-intestinal conditions, with the exception of Gram-negative bacteria and
350 Enterococci. The survival percentages were similar for both experiments, except for yeasts
351 and Enterococci. The higher level of Enterococci in cheese at the end of ripening in
352 experiment A can explain why growth resumption was observed at the end of digestion only
353 during this experiment. Regarding yeasts, the same two strains, *D. hansenii* and *G.*
354 *candidum*, were added in milk as starter. Nevertheless, other yeasts coming from raw milk
355 could be present in cheese and it could be hypothesized that yeast strains issued from raw
356 milk B were more resistant to digestion than that from raw milk A.

357 An important finding is that the survival percentages of *E. coli* O26:H11 during *in vitro*
358 digestion were different from that of *E. coli* O157:H7.

359 In the stomach, the survival of *E. coli* O157:H7 was significantly affected from 60 min
360 digestion ($P < 0.001$) compared to 90 min for *E. coli* O26:H11 ($P < 0.05$). In accordance with
361 these results, several authors have already shown the better ability of *E. coli* O26:H11 strains
362 to survive acidic pH compared to *E. coli* O157:H7 (27, 28). This may result from difference in
363 acid resistance. EHEC have evolved at least five distinct mechanisms of acid resistance,
364 including four amino acid decarboxylase-dependent systems (lysine, ornithine, arginine and
365 glutamate) and a glucose catabolite repressed system. In the present study, the activity of
366 the GAD system was tested, indicating that *E. coli* O26:H11 strain F15338 possesses normal
367 GadA/B activity whereas it represents approximately half of total GAD activity for *E. coli*
368 O157:H7 strain 721.4. *gadA* or *gadB* mutants showed mixed colors as obtained here for *E.*
369 *coli* O157:H7 (29). Then, it could be hypothesized that one of these two genes is defective in
370 O157:H7 strain 721.4.

371 In the jejunum and ileum, the growth resumption observed for *E. coli* O26:H11 was
372 more than ten-fold higher than that of *E. coli* O157:H7. This may be related to the
373 physiological state of the STEC strains during digestion. During gastric digestion, because of
374 the defective GAD system, *E. coli* O157:H7 may have some difficulties to increase its internal
375 pH leading to cell injuries. Therefore, the different mechanisms implicated in stress response
376 such as cytoplasmic and periplasmic chaperones (30) may be affected. It can explain why *E.*
377 *coli* O157:H7 has more difficulties to grow in the small intestinal compartments of the TIM
378 system compared to *E. coli* O26:H11. It could also be hypothesized that the limited growth of
379 *E. coli* O157:H7 may be the result of prophage induction. Stresses are known to induce the
380 lytic cycle of the prophage (31, 32). As the serotype O157:H7 seems more sensitive than
381 O26:H11 to digestive conditions, activation of the lambdoid prophage lytic cycle could occur
382 with this strain (and not with the *E. coli* O26:H11 strain), leading to a reduction of *E. coli*
383 O157:H7 population. The third hypothesis is that some populations of cheese microflora may
384 have reduced the growth of *E. coli* O157:H7 in the distal parts of the small intestine. Etienne-
385 Mesmin et al. (25) have shown that a probiotic yeast strain was able to significantly reduce
386 the growth renewal of *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 in the TIM system. In the present
387 study, the rate of yeast in digestive samples was significantly higher in experiment B (assay

388 with the serotype O157:H7) compared to experiment A. Then, it could be assumed that the
389 STEC O26:H11 was less impacted by yeasts than O157:H7, leading to a higher survival at the
390 end of digestion.

391 In this study, it has been demonstrated, during digestion of raw milk uncooked pressed
392 cheeses experimentally contaminated with STEC, that *E. coli* O26:H11 strain F15338A has a
393 superior ability to survive in the TIM environment compared with *E. coli* O157:H7 721.4. We
394 hypothesize that this difference results from variation in acid resistance among STEC strains
395 that may confer them or not an ecological superiority. This implies that a large number of
396 isolates should be examined to draw conclusions about survival of O157:H7 and non-O157
397 STEC, if possible in dynamic multi-compartmental *in vitro* models that more closely mimic
398 the human physiological conditions. These data, in combination with the establishment of
399 virulence traits, should allow having a better risk analysis of STEC contaminated cheeses.

400

401 **ACKNOWLEDGMENTS**

402 The authors sincerely thank Sandrine Chalancon from the EA CIDAM of the Université
403 d'Auvergne, Sarah Ganet from the LMAP-NRL STEC of VetAgro Sup and René Lavigne and
404 Robert Didienne from the URF of the INRA, for their technical assistance. This work was
405 funded by the CNIEL through a thesis grant and financial support.

406

407

- 408 1. **Nataro JP, Kaper JB.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev
409 **11**:142–201.
- 410 2. **Paton JC, Paton AW.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing
411 *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev **11**:450–479.
- 412 3. **Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM.** 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*
413 (VTEC). Vet. Microbiol. **140**:360–370.
- 414 4. **Tzschope M, Martin A, Beutin L.** 2012. A rapid procedure for the detection and
415 isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111,
416 O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from
417 ready-to-eat vegetables. Int. J. Food Microbiol. **152**:19–30.
- 418 5. **Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D,**
419 **Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J,**
420 **Lindsay D, Miszczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Cerf O.** 2013. Review of Shiga-
421 toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int.
422 J. Food Microbiol. **162**: 190-212.
- 423 6. **Baylis CL.** 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by
424 Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Int. J. Dairy Tech. **62**:293–307.

- 425 7. **Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Pihier N, Vaillant V, Francart S, Capek I, De**
426 **Valk H.** 2006. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized
427 cows cheese, France, 2005. In Abstract of the 6th International Symposium on
428 Shigatoxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. ed. Sofronidis, J.
429 Melbourne, Australia, 2006. Oct. 30–Nov. 1. West Leederville, WA: Cambridge Publ.
- 430 8. **Miszczucha SD, Perrin F, Ganet S, Jamet E, Tenenhaus-Aziza F, Montel MC,**
431 **Thevenot-Sergentet D.** 2013. Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia*
432 *coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses. *Appl.*
433 *Environ. Microbiol.* **79**:150–158.
- 434 9. **Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ.** 1995. A multicompartmental
435 dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine.
436 *ATLA.* **23**:197–209.
- 437 10. **Blanquet-Diot S, Denis S, Chalancon S, Chaira F, Cardot JM, Alric M.** 2012. Use of
438 artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing
439 the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm. Res.*
440 **29**:1444–1453.
- 441 11. **Nielsen EM, Andersen MT.** 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-
442 producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol*
443 **41**:2884–2893.
- 444 12. **Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P.** 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-
445 toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and
446 O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes*
447 **18**:185–192.
- 448 13. **Takada A, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M.** 2007. RNase E is required for induction of
449 the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci.*
450 *Biotechnol. Biochem.* **71**:158–164.
- 451 14. **Ma Z, Gong S, Richard H, Tucker DL, Conway T, Foster JW.** 2003. GadE (YhiE)
452 activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12.
453 *Mol. Microbiol.* **49**:1309–1320.
- 454 15. **Waterman SR, Small PLC.** 2003. Transcriptional expression of *Escherichia coli*
455 glutamate-dependent acid resistance genes *gadA* and *gadBC* in an *hns rpoS* mutant.
456 *J. Bacteriol.* **185**:4644–4647.
- 457 16. **Rice EW, Johnson CH, Dunnigan ME, Reasoner DJ.** 1993. Rapid glutamate
458 decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*
459 **59**:4347–4349.
- 460 17. **Eck A, Gillis JC.** 1997. Le fromage (3^e Ed.) Tec & Doc - Lavoisier.
- 461 18. **Luquet FM.** 1985. Laits et produits laitiers - vache.brebis.chevre Tec & Doc - Lavoisier.
462 Paris, France.
- 463 19. **Elashoff JD, Reedy TJ, Meyer JH.** 1982. Analysis of gastric emptying data.
464 *Gastroenterology* **83**:1306–1312.
- 465 20. **Miszczucha SD, Ganet S, Dunière L, Rozand C, Loukiadis E, Thevenot-Sergentet D.**
466 2012. Novel Real Time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk
467 cheese and raw ground meat. *J. Food Protect.* **75**:1373–1381.
- 468 21. **Madic J, Peytavin de Garam C, Vingadassalon N, Oswald E, Fach P, Jamet E, Auvray**
469 **F.** 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-
470 antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic

471 *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and
 472 O157:H7. J. Appl. Microbiol. **109**:1696–1705.

473 22. **Duffy G, Whiting RC, Sheridan JJ.** 1999. The effect of a competitive microflora, pH
 474 and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiol.
 475 **16**:299–307.

476 23. **Delbès-Paus C, Miszczycha S, Ganet S, Helinck S, Veisseire P, Pochet S, Thevenot D,**
 477 **Montel M-C.** 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia*
 478 *alvei* in a model cheese ecosystem. Int. J. Food Microbiol. **160**:212–218.

479 24. **Smith JL.** 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how
 480 bacteria overcome acid conditions. J. Food Prot. **66**:1292–1303.

481 25. **Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, Denis S, Cardot JM, Alric M, Blanquet-Diot S.**
 482 2011. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of
 483 *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Appl. Environ.
 484 Microbiol. **77**:1127–1131.

485 26. **Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia*
 486 *coli*. J. Bacteriol. **179**:2512–2518.

487 27. **Large TM, Walk ST, Whittam TS.** 2005. Variation in acid resistance among shiga
 488 toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol.
 489 **71**:2493–2500.

490 28. **Elhadidy M, Mohammed MA.** 2012. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Raw-
 491 Milk Cheese in Egypt: Prevalence, Molecular Characterization and Survival to Stress
 492 Conditions. Lett. Appl. Microbiol. **56**:120-127.

493 29. **Jung IL, Kim IG.** 2003. Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance
 494 in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **278**:22846–22852.

495 30. **Hong W, Wu YE, Fu X, Chang Z.** 2012. Chaperone-dependent mechanisms for acid
 496 resistance in enteric bacteria. Trends Microbiol. **20**:328–335.

497 31. **Imamovic L, Muniesa M.** 2012. Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga
 498 toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. PLoS One **7**:e32393.

499 32. **Schmidt H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. Res. Microbiol. **152**:687–
 500 695.

501
 502

503 **TABLE 1** Parameters of gastrointestinal digestion in the TIM system when simulating
 504 digestive conditions of a healthy adult after intake of a solid cheese suspension^a

Compartment	Vol (ml) at initial time	pH/time (min)	Secretion	t _{1/2} (min)	β coefficient
Gastric	300	2/0, 6/5, 5.7/15, 4.5/45, 2.9/90, 2.3/120, 1.8/240, 1.6/300, 1.5/360	0.25 ml/min of pepsin (2080 IU/ml), 0.25 ml/min of lipase (250.5 IU/ml), 0.25 ml/min of HCl (1.5 M) if necessary	85	1.8
Duodenal	30	Maintained at 6.0	0.5 ml/min of bile salts (4% during the first 30 min of digestion and then 2%), 0.25 ml/min of pancreatic juice (10 ³ USP/ml), 0.25 ml/min of intestinal electrolyte solution, 0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary, 23,600 IU of trypsin (at the beginning of digestion)		
Jejunal	130	Maintained at 6.9	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary		
Ileal	130	Maintained at 7.2	0.25 ml/min of NaHCO ₃ (1 M) if necessary	250	2.5

505 ^a The power exponential equation ($f = 1 - 2^{-(t/t_{1/2})^\beta}$, where f represents the fraction of meal
 506 delivered, t the time of delivery, $t_{1/2}$ the half-time of delivery, and β a coefficient describing
 507 the shape of the curve) is used for the computer control of gastric and ileal deliveries in the
 508 TIM.

509

510 **TABLE 2** Selective media used to enumerate STEC strains and the main cultivable cheese
 511 microflora

Microorganism	Selective medium	Incubation ^a
<i>E. coli</i> O26:H11 strain F15338A	coli ID medium	1 day, 37°C, A
<i>E. coli</i> O157:H7 strain 721.4	O157 ID medium + 0.05 mg/liter cefexime + 2.5 mg/liter tellurite	1 day, 37°C, A
Ripening bacteria	Cheese Ripening Bacteria Medium	10 days, 25°C, A
Thermophilic bacterial populations	M17 agar	1 day, 42°C, A
Mesophilic bacterial populations	M17 agar	1 day, 30°C, A
Gram-negative bacteria	Plate Count Agar + 1% milk + 5 mg/liter vancomycin + 5 mg/liter crystal violet	2 days, 30°C, A
Facultatively heterofermentative Lactobacilli	FH agar	3 days, 37°C, AN
Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	Mayeux, Sandine and Elliker agar	2 days, 30°C, A
Dextrane-negative lactic acid bacteria	Mayeux, Sandine and Elliker agar	2 days, 30°C, A
Enterococci	Slanetz and Bartley agar	2 days, 42°C, A
Yeasts	Oxytetracycline Glucose Agar	2 days, 25°C, A
Moulds	Oxytetracycline Glucose Agar	2 days, 25°C, A

512 ^a Cultures were incubated aerobically (A) or anaerobically (AN).

513

514 **TABLE 3** Survival of cheese microflora during cheese manufacture

Bacterial populations	Microbial counting (log ₁₀ CFU/g) ^a							
	0 h	1 h	2.25 h	1 d	7 d	14 d	20 d	35 d
Experiment A (O26:H11)								
Ripening bacteria	3.8	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	6.2 ± 0.2	7.5 ± 0.3	6.7 ± 0.2	7.9 ± 0.1	6.8 ± 0.5
Thermophilic bacterial populations	4.2	6.9 ± 0.0	6.6 ± 0.3	7.9 ± 0.2	8.6 ± 0.1	8.1 ± 0.2	8.5 ± 0.1	8.3 ± 0.1
Mesophilic bacterial populations	4.6	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.7 ± 0.0
Gram-negative bacteria	4.0	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2
Facultatively heterofermentative Lactobacilli	1.3	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.3	4.6 ± 0.1	6.9 ± 0.2	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.6	8.4 ± 0.2
Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	1.8	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.5	4.6 ± 0.2	6.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1	6.8 ± 0.2	7.1 ± 0.1
Dextrane-negative lactic acid bacteria	3.9	4.1 ± 0.0	4.2 ± 0.1	7.5 ± 0.6	7.3 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.7 ± 0.3	8.2 ± 0.1
Enterococci	2.9	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.8 ± 0.1	5.8 ± 0.6	5.7 ± 0.1
Yeasts	2.9	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	5.7 ± 1.1	7.4 ± 0.1	6.0 ± 0.5	8.0 ± 0.1	6.0 ± 0.6
Moulds	2.0	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	3.4 ± 0.7	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.5	5.9 ± 0.7	5.4 ± 0.2
Experiment B (O157:H7)								
Ripening bacteria	3.7	4.9 ± 0.0	5.0 ± 0.1	6.5 ± 0.1	7.4 ± 0.6	6.9 ± 0.4	7.1 ± 0.2	7.0 ± 0.2
Thermophilic bacterial populations	3.7	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	7.2 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.5 ± 0.0
Mesophilic bacterial populations	3.9	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2	7.6 ± 0.3	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.5	8.6 ± 0.2	8.7 ± 0.0
Gram-negative bacteria	3.6	4.2 ± 0.5	3.7 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.0
Facultatively heterofermentative Lactobacilli	2.9	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	4.5 ± 0.1	6.6 ± 0.5	7.7 ± 0.5	8.4 ± 0.1	8.7 ± 0.0

Dextrane producing <i>Leuconostoc</i>	1.3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	4.7 ± 0.2	6.9 ± 0.4	7.5 ± 0.7	7.8 ± 0.8	7.4 ± 0.3
Dextrane-negative lactic acid bacteria	3.7	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	6.8 ± 0.2	6.9 ± 0.2	7.7 ± 0.6	8.3 ± 0.2	8.6 ± 0.1
Enterococci	2.2	1.8 ± 0.7	2.3 ± 0.3	4.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.1	5.0 ± 0.6	4.8 ± 0.0
Yeasts	2.7	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.0	5.1 ± 0.3	7.3 ± 0.7	6.5 ± 0.6	6.2 ± 0.5	5.4 ± 0.0
Moulds	2.0	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.3	5.2 ± 0.7	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.3	4.0 ± 0.0

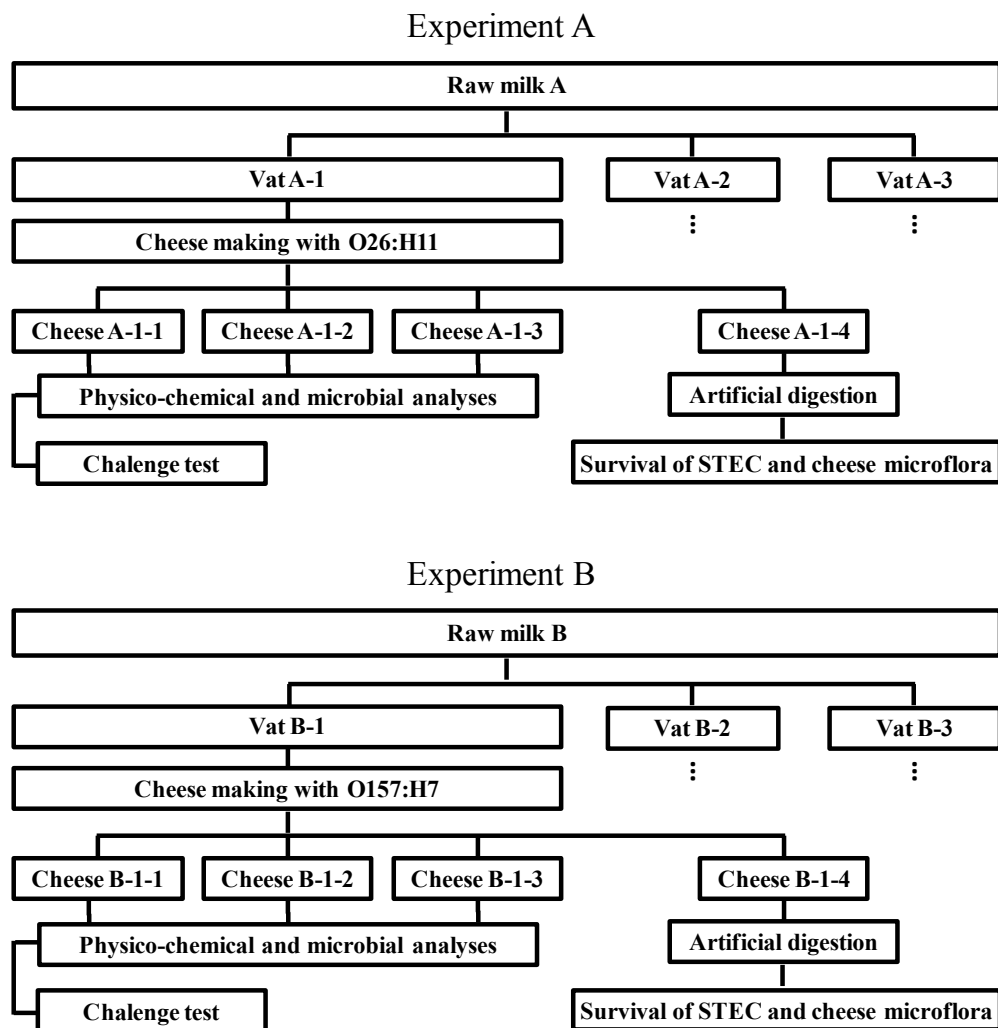
515 ^a Major cultivable cheese microflora were measured by plate counting (log₁₀ CFU/g). Data
 516 are means ± standard deviations for each experiment (n = 3).

517

518 **TABLE 4** Acid resistance of STEC strains used in this study

Serotype	Name (origin)	Virulence genes	Acido-resistance				GAD assay
			<i>rpoS</i>	<i>gadA/B</i>	<i>gadC</i>	<i>gadE</i>	
O26:H11	F15338A (raw cow's milk cheese)	<i>eae, stx₁</i>	+	+	+	+	++
O157:H7	721.4 (sheep's milk)	<i>eae, stx₂</i>	+	+	+	+	+/-

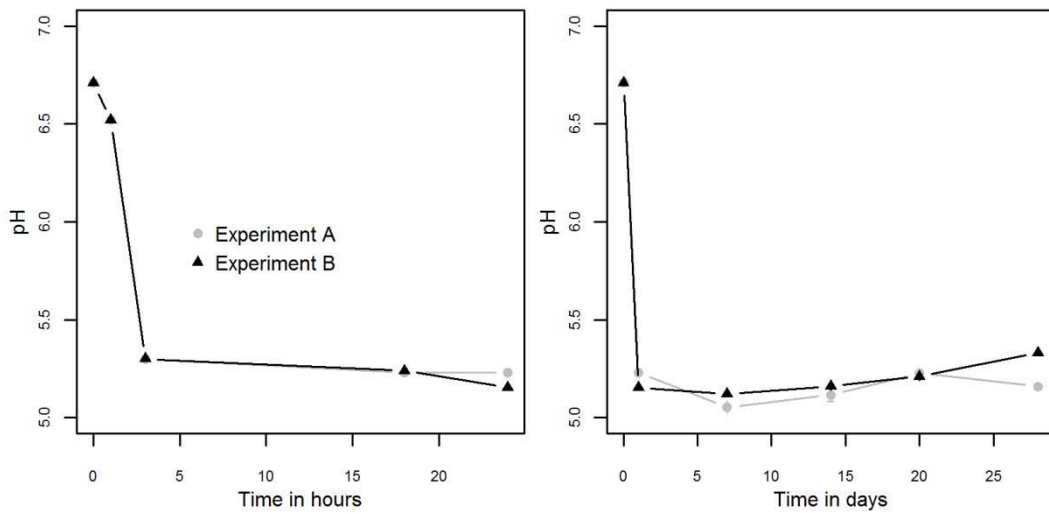
519



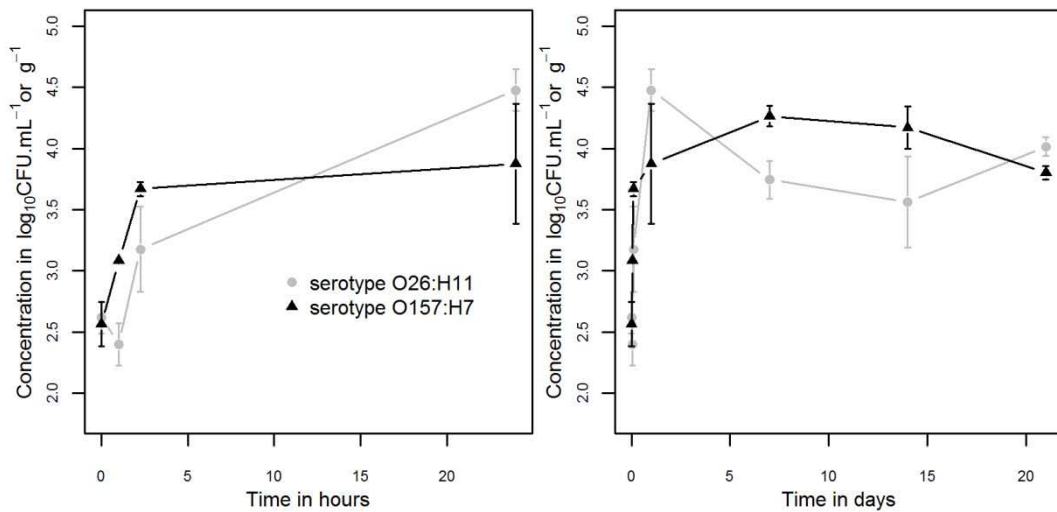
520

521 **FIG 1** Design of experiments.

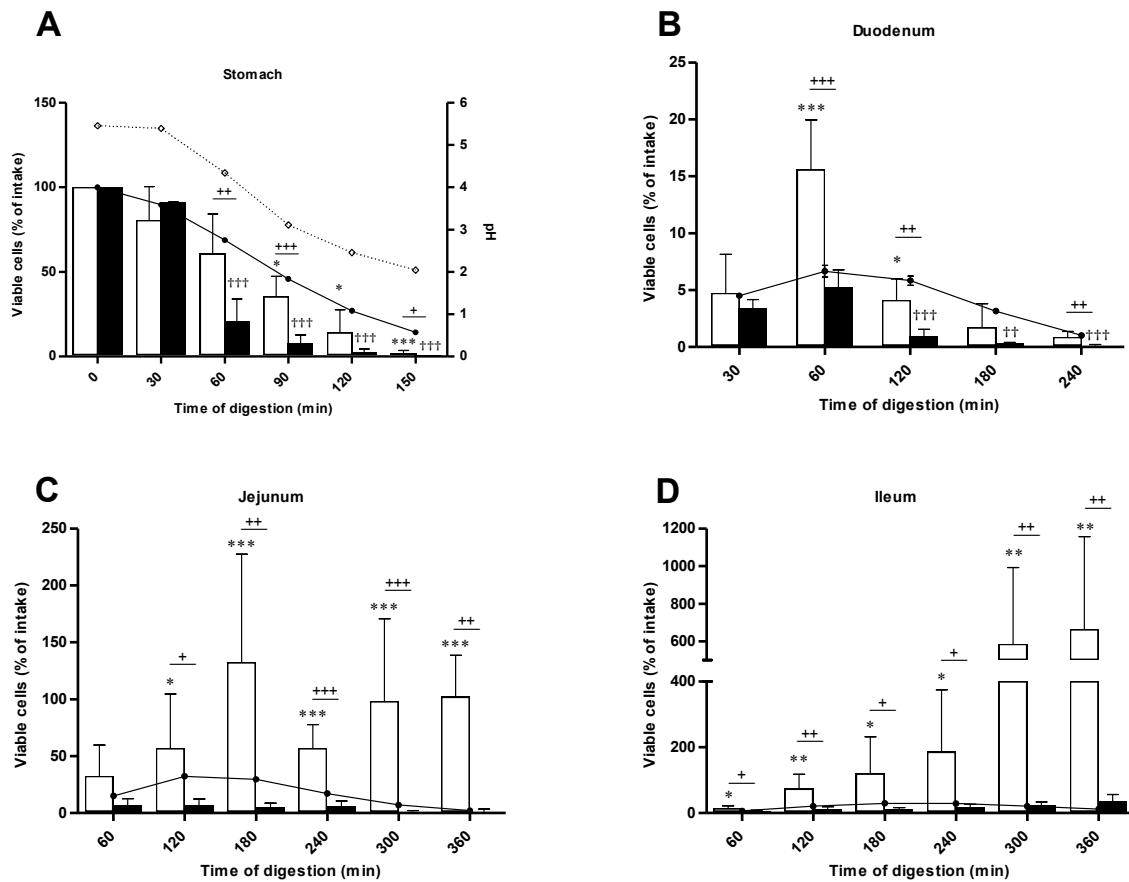
522



523
 524 **FIG 2** Physico-chemical characteristics of cheeses. The pH was regularly measured during
 525 cheese manufacturing. Results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 3$).
 526



527
 528 **FIG 3** Survival of *E. coli* O26:H11 and *E. coli* O157:H7 during cheese making and ripening.
 529 Results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 3$).
 530
 531
 532
 533
 534



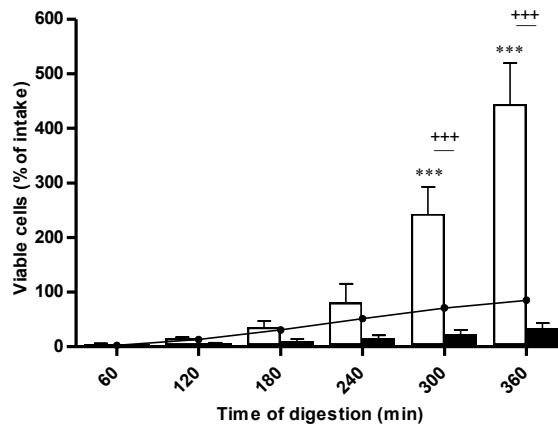
535

536 **FIG 4** Survival of STEC strains during *in vitro* digestions in the stomach (A), duodenum (B),
 537 jejunum (C) and ileum (D) of the TIM. The results obtained in each compartment for *E. coli*
 538 O26:H11 (white bar) and *E. coli* O157:H7 (black bar) are compared with that of the transit
 539 marker (black line). The fall of gastric pH is plotted (A, dotted line). Results are expressed as
 540 means percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). *E. coli* O26:H11 (*) and *E.*
 541 *coli* O157:H7 (†) results significantly different from those of the transit marker ($P < 0.05$). *E.*
 542 *coli* O26:H11 results significantly different from those of *E. coli* O157:H7 at P values of < 0.05
 543 (+).

544

545

546



547

548 **FIG 5** Survival of STEC strains in the ileal effluents of the TIM system. Cumulative ileal
 549 deliveries of *E. coli* O26:H11 (white bar) and *E. coli* O157:H7 (black bar) were plotted and
 550 compared to that of the transit marker (black line). Results are expressed as means
 551 percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). *E. coli* O26:H11 results significantly
 552 different from those of the transit marker (***, $P < 0.001$). *E. coli* O26:H11 results
 553 significantly different from those of *E. coli* O157:H7 at P values of < 0.001 (+++).

554

555

556

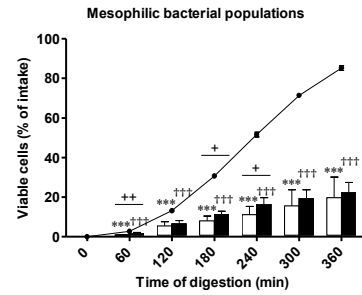
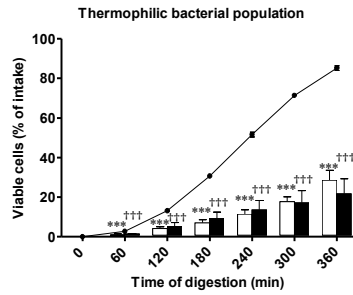
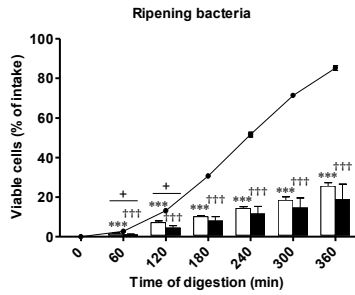
557

558

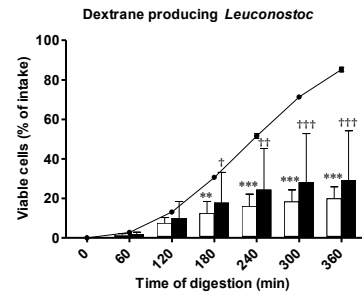
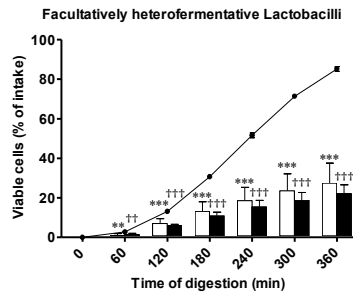
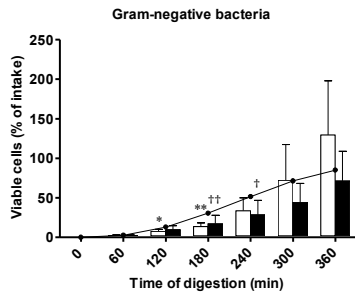
559

560

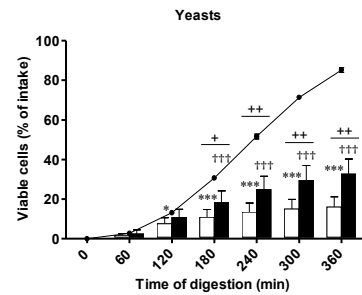
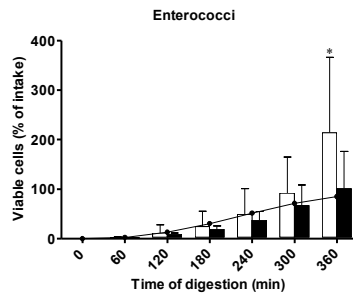
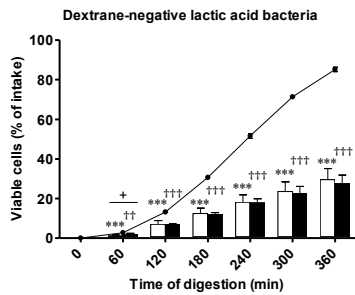
561



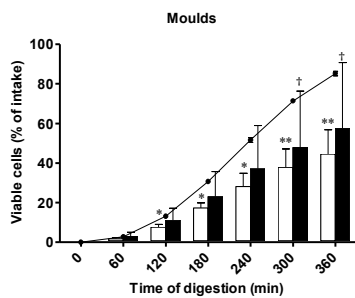
562



563



564



565

566 **FIG 6** Survival of cheese microflora in the ileal effluents of the TIM system. Cumulative ileal
 567 deliveries of the different populations in experiment A (white bar) and B (black bar) were
 568 plotted and compared to that of the transit marker (black line). Data are expressed as means
 569 percentages \pm standard deviations of initial intake ($n = 3$). Results obtained in experiment A
 570 (*) and B (†) significantly different from that of the transit marker ($P < 0.05$). Experiment A
 571 significantly different from experiment B at P values of < 0.05 (+).

Annexe 10 – Publication 4.

**Novel Real Time PCR method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk
cheese and raw ground meat.**

Stéphane D. MISZCZYCHA, Sarah GANET, Lysiane DUNIERE, Christine ROZAND,
Estelle LOUKIADIS, Delphine THEVENOT-SERGENTET.

Journal of Food Protection. 2012. Vol. 75, No. 8, Pages 1373–1381.

Novel Real-Time PCR Method To Detect *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Milk Cheese and Raw Ground Meat

STÉPHANE D. MISZCZYCHA,^{1*} SARAH GANET,^{1,2} LYSIANE DUNIERE,¹ CHRISTINE ROZAND,^{1,2}
 ESTELLE LOUKIADIS,^{1,2} AND DELPHINE THEVENOT-SERGENTET^{1,2}

¹Unité de Recherche CALITYSS/Equipe EMSA and ²Laboratoire LMAP/Laboratoire National de Référence STEC, VetAgro Sup, Université de Lyon, 1 avenue Claude Bourgelat, 69290 Marcy l'Etoile, France

MS 11-498; Received 4 November 2011/Accepted 26 February 2012

ABSTRACT

Raw milk, raw milk cheeses, and raw ground meat have been implicated in *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. Developing methods to detect these bacteria in raw milk and meat products is a major challenge for food safety. The aim of our study was to develop a real-time PCR assay to detect *E. coli* O157:H7 in raw milk cheeses and raw ground meat. Well-known primers targeting a mutation at position +93 of the *uidA* gene in *E. coli* O157:H7 were chosen, and a specific TaqMan–minor groove binder probe was designed. This probe targets another mutation, at position +191 of the *uidA* gene in *E. coli* O157:H7. The first step in the study was to evaluate the specificity of this probe with 156 different O157:H7/NM strains and 48 non-O157:H7/NM strains of *E. coli*. The sensitivity of the method was evaluated by pre- and postinoculation of cheeses and meat enrichments with different *E. coli* O157:H7 strains. All the *E. coli* O157:H7 isolates tested were positive, and none of the other bacteria were detected. Our results indicate that this method is sensitive enough to detect 10² *E. coli* O157:H7 isolates per ml of cheese or meat enrichment broth (24 h at 41.5°C) and is more sensitive than the International Organization for Standardization reference method. We can conclude that this new real-time PCR protocol is a useful tool for rapid, specific, and sensitive detection of *E. coli* O157:H7 in raw milk and raw ground meat products.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important cause of food poisoning outbreaks in humans (10, 28, 36, 46, 53). This pathogen can be responsible for gastrointestinal diseases such as diarrhea and hemorrhagic colitis. In some severe cases, complications can cause hemolytic-uremic syndrome and death (46, 71). Pathogenic STEC is also called enterohemorrhagic *E. coli* or EHEC. STEC isolates are characterized by the production of cytotoxins named Shiga toxins (encoded by the genes *stx*₁ and *stx*₂). STEC may contain other known and as-yet-unknown virulence factors encoded, for example, by the genes of the locus of enterocyte effacement pathogenic island. The locus of enterocyte effacement codes for intimin (gene *eae*) and other proteins implicated in attaching and effacing lesions on the intestinal mucosa. Several pathogenic serotypes of STEC have been described since the 1980s and have been implicated in outbreaks and hemolytic-uremic syndrome cases (9, 35, 61, 73). However, the first STEC serotype to be isolated, *E. coli* O157:H7, has been implicated in most of the foodborne outbreaks and hemolytic-uremic syndrome cases (17, 19, 38, 55, 58, 68).

Cattle are the primary reservoir of *E. coli* O157:H7 (62). Infected cattle can carry the bacteria in their gastrointestinal tract without any symptoms of disease (14,

29, 57). *E. coli* O157:H7 is excreted in cattle feces. In the meat industry, feces and hides are considered to be the main sources of *E. coli* O157:H7 carcass contamination during slaughter and dressing; this mainly occurs during skinning and evisceration (3, 5, 18). During the mincing process, whereby meat portions from multiple cows are mixed, one carcass may contaminate the entire batch of minced meat. *E. coli* O157:H7 also may be harbored in raw beef that is used in the manufacture of other meat products (25), and contamination rates often increase throughout the process (45).

In the dairy industry, detailed investigations have demonstrated that the contamination of raw milk is due to hygiene problems during milking or postprocessing and that the contaminating organisms originally derive from the raw milk or the manufacturing environment (40). Several previous studies have shown the presence of virulence genes and STEC strains in raw milk and raw milk cheeses (67, 70). These products have also been implicated in *E. coli* O157:H7 disease (6, 12, 16, 21, 31). Consumption of raw or undercooked contaminated ground beef or contaminated raw milk cheese continues to be a significant public health risk.

Raw ground meat is a very important product in France, with an estimated output of 242,000 tons in 2009 (one-third consisting of fresh raw ground beef and two-thirds consisting of frozen raw ground beef). Raw ground meat production represented 1.6 billion Euros in 2009 (<http://>

* Author for correspondence. Tel: +33 4 78 87 26 85; Fax: +33 4 78 87 26 69; E-mail: s.miszczycha@vetagro-sup.fr.

www.sniv.fr). Cheese and raw milk cheese are very popular products worldwide, with output in the European Union estimated at 9 million tons in 2009 (13). Cheese varieties play an important part in our countries' gastronomic identities. They play a part in community life and an important role in the economy, as a source of employment and a tourist attraction. Many countries in the European community have developed official labels such as PDO (Protected Designation of Origin) to protect their local cheeses. In France, for example, there are 1,000 varieties of cheeses and 42 different PDOs (<http://www.fromage-aop.com/>).

As a result, the food industry, in particular raw ground beef and raw milk cheese manufacturers, need fast, sensitive detection methods for *E. coli* O157:H7 to ensure a safe food supply. The development of such methods is a challenge for the French food industry. The main aim of this study was to develop a real-time PCR (RT-PCR) assay to detect *E. coli* O157:H7 in raw ground meat or raw milk cheeses in a single PCR assay, using a specific TaqMan probe designed to provide a high specificity. Several authors have worked on DNA-based approaches but with different methods using molecular beacons, TaqMan probes, scorpion probes, or SYBR Green (26, 34, 66, 75, 76). In our study, the protocol was based on the commonly used PCR assay targeting the highly conserved mutation at position +93 of the *uidA* (β -glucuronidase) gene in *E. coli* O157:H7 (11, 23, 24, 44). The TaqMan probe was based on another mutation of O157:H7, at position +191 of the *uidA* gene (44).

The first step in the study was designed to evaluate the specificity of these primers and probe with a large collection of different bacterial strains. In the second step, the efficiency and the sensitivity of the method were assessed with purified *E. coli* O157:H7 DNA and pre- and postenrichment inoculation of different *E. coli* O157:H7 strains in raw ground meat and raw milk cheese.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. All strains were kept in cryobeads (AEB 400100, AES Laboratories, Combourg, France) and maintained at -80°C . For the specificity study, 204 gram-positive and gram-negative bacterial strains (including 156 different *E. coli* O157:H7/NM strains and 35 other *E. coli* strains) were tested. All strains used in this study are shown in Table 1.

Food samples. A raw milk white-mold rind soft cheese and fresh raw ground beef (15% fat) were used for the sensitivity tests (pre- and postenrichment inoculations).

Specificity study. Specificity was tested on the 204 different bacterial strains described in Table 1. All strains were grown in brain heart infusion (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubated at 37°C for 24 h, and plated for 24 h at 37°C on plate count agar (bioMérieux).

Efficiency and sensitivity of the RT-PCR assay. To assess the efficiency of this RT-PCR protocol, a standard curve was obtained by PCR amplification of the *uidA* gene (11) from the *E. coli* O157:H7 Sakai strain. The PCR products (252 bp) were purified with the Nucleo spin extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and DNA was quantified by the Qubit platform according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy

Pontoise, France). Genomic DNA from *E. coli* O157:H7 Sakai was extracted with the NucliSENS easyMAG platform (bioMérieux). DNA was quantified with the Qubit platform, and the value was converted into number of molecules with the equation $n = (N_a \times c)/(660 \text{ g/mol} \times \text{bp})$, where N_a is the Avogadro constant, c is the DNA concentration in grams per microliter, and bp is the number of base pairs. The Sakai strain was selected here because the number of base pairs for this isolate had been previously established (51). PCR products and genomic DNA were then serially diluted 10-fold from 10^6 molecules to 1 molecule per μl and tested in triplicate with the RT-PCR assay. Amplification efficiency (E) was estimated by using the slope of the standard curve and the formula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$.

The sensitivity experiments were performed with one pure-strain culture of *E. coli* O157:H7 chosen at random (strain ENV 166). After growth in brain heart infusion (24 h at 37°C) and turbidity measurements using a Densimat photometer (bioMérieux), 10-fold serial dilution of 10^8 CFU of these strains per ml in tryptone salt (bioMérieux) was performed. DNA from each sample was extracted with NucliSENS easyMAG and tested by RT-PCR. Inoculation levels were checked by plating inocula on plate count agar. Colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C .

Sensitivity of the RT-PCR assay in food enrichment broths. Two different experiments were carried out: (i) a preenrichment inoculation was performed to provide a realistic scenario of the contamination that can occur in a food system, and (ii) a postenrichment inoculation was performed in order to check the limit of the RT-PCR detection.

Five *E. coli* O157:H7 strains from different sources were selected: LS 32 (human stools), ENV 166 (environment), 8073 4-1 (cheese), SB 55-1 (ground meat), and 39239 (slaughterhouse). All the inoculations were performed in triplicate and at random.

For the preenrichment inoculation, the *E. coli* O157:H7 strains were cultured separately in buffered peptone water (BPW; bioMérieux) at 37°C for 18 to 24 h and then serially diluted in tryptone salt. They were then inoculated separately into 25-g samples of cheese or meat at a rate of 1 to 5 CFU/25 g, to simulate natural contamination. After homogenization and before the enrichment protocol, the stomacher bags were stored overnight (16 h) at 4°C to obtain cold-adapted strains. Inoculation levels were checked by plating the inocula on plate count agar. Colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C . Enrichment broths were tested for the detection of *E. coli* O157:H7 after 24 h of incubation.

For the raw milk cheese, the enrichment protocol consisted of 225 ml of prewarmed medium, i.e., modified tryptone soya broth (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) with 20 mg of novobiocin (International Organization for Standardization [ISO] method 16654:2001) per ml added to a stomacher bag containing 25 g of cheese. After homogenization, the stomacher bags were incubated for 24 h at 41.5°C .

For the raw ground beef, the enrichment protocol consisted of 225 ml of prewarmed BPW added to a stomacher bag containing 25 g of meat (63). After homogenization, the stomacher bags were incubated for 24 h at 41.5°C .

For the postenrichment inoculation, after 24 h of broth enrichment incubation, the enrichment broths (cheese and meat) were inoculated with different amounts of *E. coli* O157:H7 strains. More precisely, after growth in brain heart infusion (24 h at 37°C), 10-fold serial dilutions of 10^8 CFU of these *E. coli* O157:H7 strains per ml were performed to inoculate the enrichment broths at 10^1 to 10^6 CFU/ml. Inoculation levels were checked by plating

TABLE 1. Bacterial strains tested with the RT-PCR protocol studied^a

Bacterial species	Serotype	No. of isolates	Virulence genes				No. of isolates for which LoP3-17 was positive	
			<i>eae</i> ^b	<i>stx</i> ₁ ^c	<i>stx</i> ₂ ^c	LoP3-17		
<i>E. coli</i>	O157:H7	11	+	+	+	+	11	
		62	+	-	+	+	62	
		72	+	+	-	+	72	
			7	+	-	-	+	7
	O157:NM sor+ GUD+	2	+	-	-	+	2	
	O157:NM	2	+	+	+	+	2	
	O157:ND	1	-	-	-	-	0	
	O157:H16	2	+	-	-	-	0	
	OND:H7	1	+	-	-	-	0	
	O55:H7	1	+	-	+	-	0	
	O26:H11	2	+	+	-	-	0	
			1	+	-	+	-	0
			1	+	-	-	-	0
	O26:ND	1	+	-	-	-	0	
	O103:H2	1	+	-	+	-	0	
			1	+	+	-	-	0
			3	-	-	-	-	0
	O111:H8	2	+	-	-	-	0	
			1	+	+	-	-	0
	O145:H28	1	+	+	-	-	0	
			2	+	-	-	-	0
	O123:H2	1	+	-	+	-	0	
	O6:H10	1	-	+	+	-	0	
	Ont:H8	1	-	+	+	-	0	
	O166:H28	1	-	-	+	-	0	
	O11:H43	1	-	+	-	-	0	
	O6:H1	2	-	+	+	-	0	
	O6:H10	1	-	+	-	-	0	
	O174:H8	1	+	+	+	-	0	
	ND	1	+	-	-	-	0	
			1	-	+	-	-	0
			3	-	-	-	-	0
	<i>Hafnia alvei</i>		1	ND	ND	ND	-	0
<i>Citrobacter freundii</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Salmonella</i> Infantis		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Salmonella</i> Typhimurium		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Salmonella enteritidis</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Proteus vulgaris</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Shigella sonnei</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>S. boydii</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>L. innocua</i>		1	ND	ND	ND	-	0	
<i>L. ivanovii</i>		1	ND	ND	ND	-	0	

^a -, not detected; +, detected (C_T range, between 18 and 25); ND, not determined; sor+, sorbitol fermenting; GUD+, β-glucuronidase positive.

^b Data from Nielsen and Andersen (47).

^c Data from Perelle et al. (54).

inocula on plate count agar. Colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C.

DNA purification. For pure colonies, a single colony was boiled in DNA/DNase-free water for 15 min and then centrifuged for 3 min at 16,000 × g. The supernatant containing the DNA was stored at -20°C until use.

For the enrichment broths, DNA was extracted using the NucliSENS easyMAG (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. DNA extractions were stored at -20°C. The recovered DNA was eluted and concentrated in 50 μl of the elution buffer.

Detection of the target bacteria by RT-PCR. The two primers for the particular mutation at the +93 position of the *uidA*

TABLE 2. Nucleotide sequences of primers and fluorogenic probes^a

Primer or probe	Sequence (5'-3')	Expected size
PT-2	GCG AAA ACT GTG GAA TTG GG	252 bp
PT-3	TGA TGC TCC ATC ACT TCC TG	
LoP3-17	FAM-TAT GT*G GGC AAC GTC-NFQMGB	

^a *, C-to-T mutation (+191 with respect to ATG start codon of *uidA* open reading frame) targeted by our probe.

gene were obtained from a previously published sequence (11). The primers and probe are described in Table 2. TaqMan probe LoP3-17 was designed from the *uidA* gene sequence (GenBank accession no. AF305917) and was obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA). It was labeled with 5'-FAM (6-carboxyfluorescein) and 3' MGB/NFQ (a nonfluorescent quencher) conjugated with a minor groove binder.

Each reaction mixture (30 μ l) consisted of 1 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM forward and reverse primers, 75 nM LoP3-17 probe, 1 \times IPC Mix and IPC DNA (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents, Applied Biosystems), molecular-grade H₂O, and 3 μ l of template DNA.

Thermal cycling and detection were performed using StepOne Plus (Applied Biosystems). For the PCRs, samples were heated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of melting at 95°C for 10 s and an annealing/extension step at 63°C for 30 s. Determination of the virulence genes *eae*, *stx*₁, and *stx*₂ and confirmation of the O antigen of *E. coli* O157 and the flagellar H7 antigen gene were done with the protocol previously described by Nielsen and Andersen (47) and Perelle et al. (54). Fluorescence generation was monitored for each sample at the end of the elongation steps. A fluorescent signal 10 times higher than the standard deviation of the mean baseline emission was indicative of positive detection (54).

ISO method. In parallel with the above-described method, *E. coli* O157:H7 was detected from inoculated cheese and meat by the genetic method described in ISO 16654:2001. Immunomagnetic separation (IMS) was performed with specific anti-*E. coli* O157 Dynabeads (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The immunoenriched solution of *E. coli* O157 collected was streaked onto specific media O157:H7 ID (bioMérieux) and sorbitol MacConkey agar (Biokar, Beauvais, France), with and without the addition of 0.05 mg of cefixime per liter and 2.5 mg of tellurite per liter. After 24 h of incubation at 37°C, presumptive colonies were tested with the DR 0620M *E. coli* O157 latex test (Oxoid).

Statistical analysis. R was used for the statistical analysis (analysis of variance) (56).

RESULTS

Specificity of the RT-PCR assay. All the 156 *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O157:NM isolates tested were positively recognized, with a threshold cycle (C_T) range of 18 to 25 (Table 1). None of the 48 other strains were positively detected.

Sensitivity of the RT-PCR assay. All C_T values below 38 were considered positive. The sensitivity and efficiency of the protocol were evaluated with purified amplicons of the targeted DNA sequence detected by the RT-PCR assay.

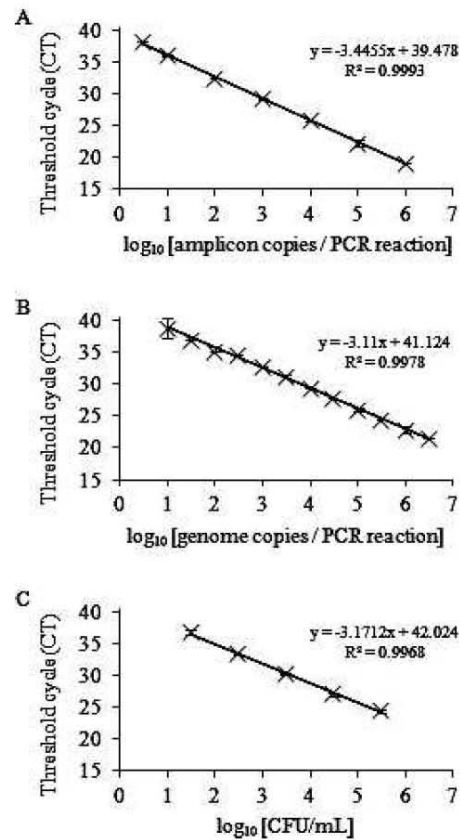


FIGURE 1. Sensitivity of the real-time PCR assay with amplicon copies of the *uidA* gene (A), complete DNA genome of *E. coli* O157:H7 Sakai (B), and DNA extracted from pure culture of *E. coli* O157:H7 ENV 166 (C).

This assay detected 3 copies of the target gene per reaction with good efficiency (95%) and high linearity over a 6-log range of 10⁶ to 3.10⁰ copies of each target per reaction (Fig. 1). The detection level for the total genomic DNA of the *E. coli* O157:H7 strain used was 10 copies per PCR (Fig. 1). From this pure culture, the method was sensitive enough to detect 30 CFU of *E. coli* O157:H7 per ml with high linearity and reproducibility.

The results of the postenrichment protocol are shown in Table 3. No *E. coli* O157:H7 organisms were detected in the uninoculated sample. One-way analysis of variance of the C_T values at the same concentration for each matrix (meat and cheese) showed no significant difference for any of the *E. coli* O157:H7 strains ($P > 0.05$). This method was sensitive enough to detect between 10² and 10³ CFU/ml in cheese enrichment broth with great reliability. The same sensitivity was observed in meat enrichment broth. At 10¹ CFU/ml, none of the assays were positive.

For the preenrichment protocol, the results are shown in Table 4. No *E. coli* O157:H7 organisms were detected in the uninoculated sample. In cheese, 13 samples were positively recognized by the RT-PCR assay with a C_T value below 38.

TABLE 3. Sensitivity of the real-time PCR assay in raw milk cheese and raw ground beef after postenrichment inoculation of the five different strains of *E. coli* O157:H7^a

Strain 8073 4-1		Strain 39239		Strain LS 32		Strain SB 55-1		Strain ENV 166	
log CFU/ml	Avg C _T (SD)	log CFU/ml	Avg C _T (SD)	log CFU/ml	Avg C _T (SD)	log CFU/ml	Avg C _T (SD)	log CFU/ml	Avg C _T (SD)
Postinoculation in raw milk cheese									
6	24.94 (0.41)	6	25.79 (1.19)	6	25.57 (0.23)	6	25.15 (0.32)	6	24.82 (0.09)
5	27.35 (0.21)	5	28.75 (0.78)	5	27.85 (0.07)	5	29.2 (0.99)	5	27.2 (0.28)
4	30.6 (0.28)	4	32.85 (2.19)	4	30.85 (0.07)	4	31.35 (0.07)	4	30.5 (1.27)
3	34.15 (0.78)	3	35.6 (0.99)	3	34.15 (0.07)	3	34.85 (0.21)	3	33.7 (0.28)
2	37.05 (0.07)	2	37.6 (0.42)	2	36.8 (0.28)	2	37.91 (0.04)	2	36.25 (0.49)
1	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1	ND
Postinoculation in raw ground beef									
6	24.70 (0.07)	6	25.49 (0.12)	6	24.67 (0.38)	6	25.35 (0.07)	6	25.49 (0.9)
5	28.13 (0.01)	5	28.36 (0.14)	5	27.99 (0.22)	5	28.75 (0.36)	5	28.27 (0.31)
4	30.52 (0.12)	4	31.01 (0.15)	4	30.5 (0.01)	4	31.16 (0.24)	4	30.89 (0.62)
3	33.86 (0.04)	3	33.99 (0.05)	3	33.88 (0.23)	3	34.37 (0.02)	3	34.05 (0.28)
2	37.38 (0.28)	2	36.74 (0.19)	2	37.13 (0.34)	2	37.95 (1.11)	2	36.46 (0.56)
1	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1	ND

^a Assays were done in triplicate. ND, not detected.

One assay showed a C_T value higher than 38. It was considered a negative result. In another assay, no STEC O157:H7 strain was detected. The ISO IMS reference method was applied to evaluate our RT-PCR results. Twelve of the 13 strains identified with C_T values below 38 were confirmed by the IMS method; the other assay did not show positive results. None of the ENV 166 strains were isolated by the IMS method. In meat, 15 assays tested positive by the RT-PCR with a C_T value of less than 28. The 15 assays tested positive by the IMS ISO reference method.

DISCUSSION

E. coli O157:H7 has been implicated in the majority of foodborne outbreaks and hemolytic-uremic syndrome cases involving STECs. In recent years, raw and cooked milk cheeses have been implicated in STEC disease (6). Pathogenic bacteria that can be transmitted by cheese varieties are of great importance to the dairy industry. Other major food sources associated with foodborne *E. coli* O157:H7 infection are beef products such as ground beef (32, 38), a highly perishable and popular product. The sensitivity, specificity, and speed of testing methods for *E. coli* O157:H7 are of great interest to the food industry and would benefit consumers. The French authorities recommend a search for various highly pathogenic STEC serotypes including O157:H7 (1). Methods for detecting these pathogenic bacteria in food are therefore crucial.

The aim of this study was to develop a specific and sensitive PCR method to detect *E. coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat. For this reason, the primers described previously by Cebula et al. (11), PT-2 and PT-3, were used. They targeted the highly conserved +93 mutation of the *uidA* gene to identify the O157:H7 serotype (11, 34, 44, 75, 76). More precisely, a double mismatch built into the 3' end of the forward primer reduces amplification of the non-O157:H7 *uidA* gene (11). But

where a double mismatch exists in non-O157:H7 genotypes, only a single mismatch to the O157:H7/H⁻ *uidA* sequence occurs, resulting in preferential amplification of serotype O157:H7/NM. Targeting this region thus identifies *E. coli* O157:H7 in one step, without testing for O157 antigen and H7 flagellar antigen separately. It saves time and money, is easily reproducible, and can be useful in characterizing the serotype of an unknown strain.

The specific probe LoP3-17 was based on another mutation in the β-glucuronidase gene at position +191 (44). In that study, this mutation, like the +93 mutation, resulted in amino acid changes, but none of these mutations inhibited β-glucuronidase activity. Monday et al. (44) have postulated that the loss of β-glucuronidase activity was the result of a G-G insertion at position +686, causing a frameshift and early termination of the enzyme. The loss of β-glucuronidase activity appeared after the loss of the sorbitol fermentation. We chose this +191 mutation because other authors have since used it to build the *uidAR383* primer (34, 75, 76). Protocols using this primer coupled with other primers or probes targeting the +93 mutation of *uidA* have proved to be specific to *E. coli* O157:H7/NM. The method can be made more specific by targeting both of these mutations together. The hybridization temperature used for the two primers was 63°C as described previously (11). This temperature was used for the hybridization and elongation step in this protocol. The LoP3-17 probe was built in order to place the mismatch in the central third of the probe in such a way as to maximize differences in duplex stability between matched and mismatched sequences (41). A nonfluorescent quencher conjugated with a minor groove binder was used to increase the stability of the duplex probes and single-stranded DNA targets (39).

In addition, the use of an internal positive control (Applied Biosystems) enabled us to detect PCR inhibition

TABLE 4. Detection of *E. coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground beef during the preenrichment protocol by RT-PCR and IMS assays^a

Preinoculation in raw milk cheese				Preinoculation in raw ground beef			
Strain	RT-PCR LoP317			Strain	RT-PCR LoP317		
	Detection	C _T value	Detection by IMS		Detection	C _T value	Detection by IMS
LS 32	+	36.9	+	LS 32	+	26.5	+
	+	31.8	+		+	27.3	+
	+	30.9	+		+	26	+
39239	+	36.1	+	39239	+	23.9	+
	+	35.6	+		+	22.8	+
	+	36.3	+		+	25.2	+
ENV 166	–	ND	–	ENV 166	+	27.7	+
	–	39.3	–		+	24.6	+
8073 4-1	+	37.1	–	8073 4-1	+	24.7	+
	+	36.2	+		+	27.9	+
	+	35.6	+		+	24.5	+
SB 55-1	+	36.1	+	SB 55-1	+	25	+
	+	35	+		+	23.1	+
	+	34	+		+	24.6	+
Control	–	32.6	–	Control	–	24.1	–
	–	ND	–		–	ND	–

^a Assays were done in triplicate. +, organism detected; –, organism not detected; ND, not detected.

and false-negative results. Food matrices, raw milk cheese and raw ground meat in particular, are compositionally complex, with high levels of background microflora, proteinase, and fat that could inhibit PCR (30, 59, 60, 63, 64).

A large collection of different strains were tested to ensure the specificity of this RT-PCR protocol. All the *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O157:NM strains were positively recognized by the RT-PCR, even the sorbitol-fermenting and β -glucuronidase-positive strains. The currently used sorbitol test or β -glucuronidase activity test on selective agar (7) yields ambiguous results because these media cannot distinguish sorbitol-fermenting or β -glucuronidase-positive *E. coli* O157:H7 strains. Moreover, strains that are known to cross-react with various *E. coli* O157:H7 detection tools were negatively recognized, such as *E. coli* O55:H7 (which is believed to be the ancestor of *E. coli* O157:H7 (24, 74)) and non-H7 *E. coli* O157, which can be positively recognized by other methods (8, 42, 48, 49, 65).

The performance of this protocol was evaluated with amplicons of the target and purified genomic DNA of *E. coli* O157:H7 strains. A detection threshold of 3 copies of the amplicon and 10 copies of the genomic DNA per PCR was determined with high efficiency and reproducibility. This sensitivity was confirmed by the assay with a pure culture strain, which allowed detection of 30 to 100 CFU of *E. coli* O157:H7 per ml.

In an attempt to confirm the same level of sensitivity in a complex matrix, real-time PCR was performed in artificially inoculated cheese enrichment broth. Five *E. coli* O157:H7 strains from different origins were selected. They possessed the *eae*, *stx*₁, and *stx*₂ genes. Raw milk white-mold rind soft cheese was chosen because it is an emblem of

French gastronomy. This type of cheese was implicated in an outbreak in France in 2005 (20). Raw ground beef was chosen because the presence of *E. coli* O157:H7 in ground beef continues to present a significant health risk worldwide (22).

The postenrichment protocol showed that this RT-PCR assay was sensitive enough to detect *E. coli* O157:H7/NM at a level of 10² *E. coli* isolates per ml of cheese or meat enrichment broth.

Other studies based on scorpion probe RT-PCR or IMS combined with a TaqMan PCR assay reported a detection limit for *E. coli* O157:H7 of 10² CFU/ml in pure broth culture and 10³ CFU/ml in skim milk or raw ground beef enrichment broth (27, 66). Similar detection levels, between 2 × 10² and 1 × 10³ CFU/ml in pure broth culture, have been previously determined with molecular beacon probes (26). Our protocol provided a lower detection level of *E. coli* O157:H7 than these other methods in food enrichment broth.

The aim of the preenrichment protocol was to simulate natural contamination with cold-adapted strains. The cheese enrichment procedure was the same as described in ISO 16654:2001, and the results of the RT-PCR assays were compared with the IMS method. BPW was chosen for raw ground meat enrichment because it has been reported to perform better than five other enrichment media (modified tryptone soya broth, modified *E. coli* broth, EHEC broth, and modified BPW) for enhancing the growth of the strains tested and improving the sensitivity of detection methods (33, 50). For the cheese assay, 13 of the 15 assays tested positive by this method and 1 assay was identified with a C_T value higher than 38, which may be dubious and was not identified by the IMS method. Indeed, interpretation of high

C_T values is difficult and generally arbitrary (43). Another sample was negatively recognized by both IMS and RT-PCR. The possibility that no *E. coli* O157:H7 organisms were inoculated in these two cheese samples cannot be excluded.

One positive sample with a C_T value below 38 was not detected by IMS. IMS appears to be less sensitive for detection than RT-PCR (4, 72). Even though detection and strain isolation are not comparable, it must be emphasized that STEC isolation methods are substantially less sensitive than molecular methods for detecting these pathogens (52). Nevertheless, isolation of a live pathogen culture is still essential and has to be improved.

Various factors might explain the high C_T values recorded for the cheese matrices. First of all, the inoculation level used for this experiment was equivalent to 0.04 to 0.2 CFU/g. Recorded STEC contamination levels in milk products are <1 CFU/ml (6, 15). After cheese inoculation, samples were stored overnight at 4°C; food products, cheeses particularly, are generally refrigerated. Since refrigeration may cold adapt STEC strains, it is necessary to be able to detect cold-adapted *E. coli* O157:H7 strains (69). Raw milk cheese with an indigenous microflora was used for this assay. Little is understood about the interactions that can occur between *E. coli* O157:H7 and the natural microflora found in cheese (6), so competition during enrichment cannot be excluded. All these elements might explain the high C_T values after enrichment, indicating limited growth of STEC. The enrichment procedures for raw milk cheese samples need improvement. Finally, all strains not recognized by the IMS method were the same strain: *E. coli* O157:H7 ENV 166. It cannot be excluded that this strain is more sensitive to stress (cold or competition from natural microflora of cheese) and cannot grow on specific media after IMS owing to a viable but nonculturable state (2, 37). For the meat assays, all 15 assays were positively recognized both by our RT-PCR method and by IMS. In contrast to the cheese assays, all C_T values recorded after enrichment were below 28, suggesting that the *E. coli* O157:H7 strains were growing strongly. Savoye et al. (63) have demonstrated that the BPW and conditions used (e.g., 25 g of sample and enrichment at 41.5°C for 24 h) allow *E. coli* O157:H7 to grow despite the background microflora of the raw ground meat.

To conclude, this article has described a new low-cost, rapid, one-step detection method for *E. coli* O157:H7 in raw milk cheese and raw ground meat.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Caprioli for providing the *E. coli* O55:H7 strain.

REFERENCES

1. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2011. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la révision de la définition des EHEC majeurs typiques. Saisine n° 2010-SA-0031, 2011. ANSES, Maisons-Alfort, France. Available at: <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031-2.pdf>. Accessed 1 October 2011.
2. Asakura, H., K. Kawamoto, Y. Haishima, S. Igimi, S. Yamamoto, and S. Makino. 2008. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res. Microbiol.* 159:709–717.
3. Aslam, M., F. Nattress, G. Greer, C. Yost, C. Gill, and L. McMullen. 2003. Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2794–2799.
4. Auvray, F., C. Lecureuil, J. Taché, V. Leclerc, V. Deperrois, and B. Lombard. 2007. Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Letts. Appl. Microbiol.* 45:646–651.
5. 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.
6. Baylis, C. L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62:293–307.
7. Bettelheim, K. A. 2005. Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. *J. Appl. Microbiol.* 99:408–410.
8. Bettelheim, K. A., H. Evangelidis, J. L. Pearce, E. Sowers, and N. A. Strockbine. 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* 31:760–761.
9. Blanco, J. E., M. Blanco, M. P. Alonso, A. Mora, G. Dahbi, M. A. Coira, and J. Blanco. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* 42:311–319.
10. Bugarel, M., L. Beutin, A. Martin, A. Gill, and P. Fach. 2010. Microarray for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans. *Int. J. Food Microbiol.* 142:318–329.
11. 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.
12. Centers for Disease Control and Prevention. 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows—California, 2006. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 57:625–628.
13. Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. 2010. L'économie laitière en chiffres. Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris.
14. Chapman, P. A., A. T. Cerdán Malo, M. Ellin, R. Ashton, and M. A. 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.
15. D'Amico, D. J., E. Groves, and C. W. Donnelly. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.* 71:1580–1589.
16. Denny, J., M. Bhat, and K. Eckmann. 2008. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:321–328.
17. Dobson, R. 2006. Report on *E. coli* outbreak recommends review of guidance. *BMJ* 332:72.
18. Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2999–3003.
19. Espié, E., F. Grimont, P. Mariani-Kurkdjian, P. Bouvet, S. Haeghebaert, I. Filliol, C. Loirat, B. Decludt, N. N. Minh, V. Vaillant, and H. De Valk. 2008. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor

- O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:595–601.
20. Espié, E., P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, N. Pihier, V. Vaillant, S. Francart, I. Capek, and H. De Valk. 2006. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005. In J. Sofronidis (ed.), Abstracts of the 6th International Symposium on Shigatoxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne, Australia, 30 October to 1 November 2006. Cambridge Publishers, West Leederville, WA.
 21. Espié, E., V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. De Valk, and C. Vernozy-Rozand. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* 134:143–146.
 22. Feldsine, P. T., D. E. Kerr, S. C. Leung, A. H. Lienau, R. F. Moser, and L. A. Mui. 2002. Visual immunoprecipitate assay eight hour method for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in raw and cooked beef (modification of AOAC Official Method 996.09): collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1029–1036.
 23. Feng, P., and K. A. Lampel. 1994. Genetic analysis of uidA expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology* 140(Pt. 8):2101–2107.
 24. 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.
 25. Flores, R. A., and T. E. S. Tewart. 2006. Empirical distribution models for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef produced by a mid-size commercial grinder. *J. Food Sci.* 69:M121–M126.
 26. 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.
 27. Fu, Z., S. Rogelj, and T. L. Kieft. 2005. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 99:47–57.
 28. Griffin, P. M., 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.
 29. Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriott, and L. V. Carpenter. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35: 11–19.
 30. Herman, L., and H. De Ridder. 1993. Cheese components reduce the sensitivity of detection of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction. *Neth. Milk Dairy J.* 47:23–29.
 31. Honish, L., G. Predy, N. Hislop, L. Chui, K. Kowalewska-Grochowska, L. Trotter, C. Kreplin, and I. Zazulak. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can. J. Public Health* 96:182–184.
 32. Hussein, H. S. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.* 85:E63–E72.
 33. Hussein, H. S., and L. M. Bollinger. 2008. Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:227–244.
 34. Jinneman, K. C., K. J. Yoshitomi, and S. D. Weagant. 2003. Multiplex real-time PCR method to identify Shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H- serotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6327–6333.
 35. Johnson, K. E., C. M. Thorpe, and C. L. Sears. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 43:1587–1595.
 36. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15–38.
 37. Khan, M. M. T., B. H. Pyle, and A. K. Camper. 2010. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5088–5096.
 38. King, L. A., A. Mailles, P. Mariani-Kurkdjian, C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, F. Grimont, N. Pihier, H. Devalk, F. Perret, E. Bingen, E. Espié, and V. Vaillant. 2009. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol. Infect.* 137:889–896.
 39. Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, and J. Hedgpeth. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28:655–661.
 40. Little, C. L., J. R. Rhoades, S. K. Sagoo, J. Harris, M. Greenwood, V. Mithani, K. Grant, and J. McLauchlin. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol.* 25:304–312.
 41. Livak, K. J. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* 14:143–149.
 42. Ludwig, K., M. Bitzan, S. Zimmermann, M. Kloth, H. Ruder, and D. E. Müller-Wiefel. 1996. Immune response to non-O157 Vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 174:1028–1039.
 43. Mackay, I. M. 2007. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Caister Academic Press, Norwich, England.
 44. Monday, S. R., T. S. Whittam, and P. C. Feng. 2001. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 184:918–921.
 45. Nastasijevic, I., R. Mitrovic, and S. Buncic. 2008. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Sci.* 82:101–105.
 46. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
 47. Nielsen, E. M., and M. T. Andersen. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:2884–2893.
 48. Niroomand, F., and C. Lord. 1994. Comparison of rapid techniques for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 3:85–96.
 49. 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.
 50. Ogden, I. D., N. F. Hepburn, and M. MacRae. 2001. The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 91:373–379.
 51. Ogura, Y., T. Ooka, Asadulghani, J. Terajima, J.-P. Nougayrède, K. Kurokawa, K. Tashiro, T. Tobe, K. Nakayama, S. Kuhara, E. Oswald, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8:R138.
 52. Ohtsuka, K., M. Tanaka, T. Ohtsuka, K. Takatori, and Y. Hara-Kudo. 2010. Comparison of detection methods for *Escherichia coli* O157 in beef livers and carcasses. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:1563–1567.
 53. Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:450–479.
 54. Perelle, S., F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* 18:185–192.
 55. Rangel, J. M., P. H. Sparling, C. Crowe, P. M. Griffin, and D. L. Swerdlow. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11:603–609.
 56. R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: <http://www.R-project.org>. Accessed 1 October 2011.
 57. Renter, D. G., J. M. Sargeant, R. D. Oberst, and M. Samadpour. 2003. Diversity, frequency, and persistence of *Escherichia coli* O157

- strains from range cattle environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 542–547.
58. 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.
59. Rossen, L., K. Holmstrøm, J. E. Olsen, and O. F. Rasmussen. 1991. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 14:145–151.
60. Rossen, L., P. Nørskov, K. Holmstrøm, and O. F. Rasmussen. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37–45.
61. Rubino, S., P. Cappuccinelli, and D. J. Kelvin. 2011. *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5:437–440.
62. Sarimehmetoglu, B., M. H. Aksoy, N. D. Ayaz, Y. Ayaz, O. Kuplulu, and Y. Z. Kaplan. 2009. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control* 20:357–361.
63. Savoye, F., P. Feng, C. Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal, and D. Thevenot. 2011. Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with real-time PCR and a reference method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef and trimmings. *J. Food Prot.* 74:6–12.
64. Sergentet-Thevenot, D., M. P. Montet, and C. Vernozy-Rozand. 2008. Challenges to developing nucleic acid sequence based amplification technology for the detection of microbial pathogens in food. *Rev. Med. Vet.* 159:514–527.
65. Sharma, V. K., E. A. Dean-Nystrom, and T. A. Casey. 1999. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxinogenic *E. coli*. *Mol. Cell. Probes* 13:291–302.
66. Singh, J., V. K. Batish, and S. Grover. 2009. A scorpion probe-based real-time PCR assay for detection of *E. coli* O157:H7 in dairy products. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:395–400.
67. Stephan, R., S. Schumacher, S. Corti, G. Krause, J. Danuser, and L. Beutin. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J. Dairy Sci.* 91:2561–2565.
68. Teunis, P., K. Takumi, and K. Shinagawa. 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Anal.* 24:401–407.
69. 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.
70. Vernozy-Rozand, C., M. P. Montet, M. Berardin, C. Bavai, and L. Beutin. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:235–241.
71. Verweyen, H. M., H. Karch, M. Brandis, and L. B. Zimmerhackl. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr. Nephrol.* 14:73–83.
72. Vimont, A., C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, C. Bavai, B. Fremaux, and M.-L. Delignette-Muller. 2007. Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Vet. Microbiol.* 123:274–281.
73. Werber, D., A. Fruth, A. Liesegang, M. Littmann, U. Buchholz, R. Prager, H. Karch, T. Breuer, H. Tschäpe, and A. Ammon. 2002. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J. Infect. Dis.* 186:419–422.
74. Wick, L. M., W. Qi, D. W. Lacher, and T. S. Whittam. 2005. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 187:1783–1791.
75. Yoshitomi, K. J., K. C. Jinneman, and S. D. Weagant. 2003. Optimization of a 3'-minor groove binder-DNA probe targeting the *uidA* gene for rapid identification of *Escherichia coli* O157:H7 using real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* 17:275–280.
76. Yoshitomi, K. J., K. C. Jinneman, and S. D. Weagant. 2006. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes* 20:31–41.