

Université de Montréal

Caractérisation du risque associé à la consommation de saucissons secs contaminés
par *Escherichia coli* O157:H7

par

Fadia Naim

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

décembre, 2003

©Fadia Naim, 2003

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



SF

607

U54

2004

v.011

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Cette thèse intitulée :

Caractérisation du risque associé à la consommation de saucissons secs contaminés
par *Escherichia coli* O157:H7

présentée par :

Fadia Naim

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Robert Higgins, président du jury

Dr Gabriel Piette, directeur de recherche

Dr Serge Messier, co-directeur de recherche

Dr Sylvain Quessy, membre du jury

Dr Pascal Delaquis, examinateur externe

SOMMAIRE

Dans un modèle expérimental, nous avons évalué l'influence de la méthode de préparation de l'inoculum, du niveau d'inoculation, et de la procédure d'inoculation sur l'inactivation de *E. coli* O157:H7 durant la fabrication de saucissons secs. Nous avons étudié différentes conditions de fermentation (température, pH final, présence ou absence de phase de garde en pré-séchage) et de séchage (a_w 0.91 ou 0.79), en utilisant trois souches en culture pure. Quelle que soit la température de fermentation, le procédé de fermentation-séchage a entraîné environ $2 \log_{10}$ UFC/g de réduction lorsque le séchage était interrompu à une valeur d'activité de l'eau (a_w) de 0.91. La réduction de la concentration de l'inoculum de 7.3 à 4.7 \log_{10} UFC/g n'a pas affecté le niveau de destruction de la bactérie. Par contre, une destruction supplémentaire d'environ $1 \log_{10}$ UFC/g a été obtenue lorsque les cellules de *E. coli* O157:H7 ont été inoculées à la surface des morceaux de viande 7 jours avant la production de saucisses (simulant la voie normale de contamination de l'abattoir aux divers procédés de transformation), au lieu d'être introduites dans la mûlée crue. L'addition d'une phase de garde en pré-séchage a significativement augmenté ($p \leq 0.05$) la destruction du micro-organisme lorsque la fermentation a eu lieu à 37°C (pas à 24°C). Cependant, d'importantes réductions (4 à 5 \log_{10} CFU/g) n'ont été obtenues que dans les saucisses intensément séchées (a_w 0.79). Pour générer de nouvelles données permettant d'analyser de façon plus fine le risque associé à l'ingestion accidentelle de produits contaminés, des saucisses inoculées durant la formulation ($\geq 2 \times 10^7$ UFC/g) ont été soumises à un processus de digestion *in vitro* pour évaluer la tolérance au transit gastro-intestinal des cellules stressées par le procédé de fabrication. Le processus a été effectué sans (digestion statique) et avec (digestion dynamique) compensation pour l'effet tampon des saucisses (acidification avec HCl 12 N) et

vidange périodique (30 min) du contenu gastrique. Des réductions en nombre de *E. coli* O157:H7 ont été observées dans les conditions gastriques les plus sévères, correspondant à 120 min de digestion avec baisse graduelle du pH jusqu'à une valeur ≤ 2.18 . La croissance dans le compartiment intestinal a été observée pour des populations préalablement exposées aux conditions gastriques modérées, à des périodes de 30, 60, et 90 min à $\text{pH} \geq 2.5$. L'influence du procédé de fabrication des saucisses et de la digestion sur l'expression des gènes *stx1* et *stx2* et la production de toxines actives par *E. coli* O157:H7 a été évaluée par un PCR à transcription inverse et le test standard de toxicité sur des cellules Véro, utilisant des cultures dans le TSBG (contrôles positifs) et des saucisses inoculées non digérées et digérées (digestions minimale et maximale de 30 et 120 min, respectivement). Tous les extraits de saucisses contaminées ont produit des bandes d'amplification pour les ARNm des gènes *stx1* et *stx2*, indiquant que les cellules stressées exprimaient ces gènes de virulence. Les résultats obtenus en utilisant le test de toxicité sur les cellules Véro ont indiqué que : 1) la production de toxines dans le surnageant de cultures de veille (contrôles positifs) était reliée à la concentration des cellules de *E. coli* O157:H7; 2) la production de toxines dans le surnageant de saucisses était reliée à l'intensité du stress gastrique, sans égard à la concentration. Plus précisément, la production maximale de toxines a été obtenue dans les filtrats de saucisses ayant subi une digestion maximale, suivis des saucisses ayant subi une digestion minimale, puis des saucisses non digérées.

Mots clés : *Escherichia coli* O157:H7, saucisson sec, destruction, fermentation-séchage, digestion *in vitro*, pouvoir cytotoxique, expression des gènes *stx*.

SUMMARY

The influence of inoculum preparation, inoculation level, and inoculation procedure on *E. coli* O157:H7 inactivation during the manufacture of sausages under various conditions of fermentation (temperature, final pH, with or without predrying holding phase) and drying (to a_w 0.91 or 0.79) was evaluated in a model study, using three different strains inoculated in pure culture. About 2 \log_{10} CFU/g reduction in *E. coli* O157:H7 were generally obtained after drying to a_w 0.91, irrespective of fermentation temperature. While the extent of inactivation was unchanged when inoculation level was decreased from 7.3 to 4.7 \log_{10} CFU/g, cell destruction was approximately 1 \log_{10} CFU/g higher when inoculation was done at surface of beef cuts 7 days prior to processing, rather than in the batter. The addition of a 5-day predrying holding phase at fermentation temperature significantly increased ($p \leq 0.05$) the pathogen inactivation when fermentation occurred at 37°C. However, significant pathogen destruction (4 to 5 \log_{10} CFU/g) was only achieved in extensively dried sausages (a_w 0.79). In order to provide new data to refine the risk analysis associated to the consumption of contaminated products, sausages inoculated during the formulation step with *E. coli* O157:H7 (ca. 2×10^7 CFU/g) were submitted to an *in vitro* digestion process to evaluate the tolerance of stressed cells to the gastro-intestinal transit. Digestion was carried out with (dynamic digestion experiment) and without (static digestion experiment) compensation for the buffering effect of the sausages (acidification with 12 N HCl) and periodic gastric emptying (30-min intervals). Pathogen destruction occurred only under the most severe gastric conditions, during the last 30 min, coinciding with a drop in pH to ≤ 2.18 . Subsequent growth occurred for cell populations contained in the first fractions released in the intestinal compartment (after 30, 60 and 90 min of gastric challenge), but only one of the three

strains tested was able to grow after exposure to the most severe gastric conditions. The influence of the manufacturing process and digestion on subsequent expression of *stx1* and *stx2* genes as well as the production of active toxins was evaluated by Reverse Transcriptase-PCR and the Vero cell system, using *E. coli* cultures in TSBG as positive controls, undigested and digested sausages (minimum and maximum gastric digestion corresponding to 30 and 120 min, respectively). All inoculated sausage extracts produced bands for both *stx1* and *stx2* mRNA, indicating that toxin gene expression was not inhibited in stressed *E. coli* cells. Results obtained using the Vero cell assay indicated that: 1) toxin productivity by the positive controls in TSBG was related to the pathogen cell concentration; 2) however, toxin production in sausage filtrates was related to the stress intensity, regardless of the pathogen concentration. Accordingly, the highest toxin production was detected in filtrates from maximally digested sausages, followed by minimally digested and then undigested sausages.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, dry sausages, inactivation, fermentation-drying process, *in vitro* digestion challenge, cytotoxic potential, *stx* genes expression.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xx
REMERCIEMENTS.....	xxvi
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
2.1. <i>Escherichia coli</i> générique.....	7
2. 1. 1. Caractéristiques générales et sérotypie.....	7
2. 2. <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes.....	8
2. 2. 1. Les ETEC.....	8
2. 2. 2. Les EaggEC.....	9
2. 2. 3. Les EIEC.....	9
2. 2. 4. Les DEAC.....	9
2. 2. 5. Les EPEC.....	10
2. 2. 6. Les EHEC.....	10

2. 3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	10
2. 3. 1. Caractéristiques générales.....	10
2. 3. 2. Résistance à l'acidité.....	11
2. 3. 2. 1. Systèmes de résistance à l'acidité.....	13
2. 3. 2. 1. 1. Systèmes associés à la phase log.....	13
2. 3. 2. 1. 2. Systèmes associés à la phase stationnaire.....	14
2. 3. 3. Dose infectieuse.....	17
2. 3. 4. Infection et manifestations cliniques.....	18
2. 3. 4. 1. Histopathologie de l'infection.....	19
2. 3. 5. Déterminants de virulence.....	20
2. 3. 5. 1. Locus d'effacement des entérocytes.....	20
2. 3. 5. 2. Les toxines.....	21
2. 3. 5. 2. 1. Nomenclature.....	21
2. 3. 5. 2. 2. Structure des Stx.....	22
2. 3. 5. 2. 3. Génétique des Stx.....	22
2. 3. 5. 2. 4. Internalisation et mode d'action des Stx.....	23
2. 3. 5. 3. Plasmide pO157.....	24
2. 3. 6. Réservoir et transmission.....	25
2. 3. 7. Identification et typage.....	27
2. 3. 7. 1. Méthodes basées sur les caractéristiques phénotypiques.....	27
2. 3. 7. 2. Méthodes basées sur la détection des toxines, des gènes de toxines ou d'autres déterminants de virulence.....	30
2. 3. 7. 3. Méthodes basées sur le sous typage moléculaire.....	33
2. 3. 8. Maîtrise de l'infection.....	35

2. 3. 8. 1. Les antibiotiques.....	35
2. 3. 8. 2. Les antipéristaltiques.....	37
2. 3. 8. 3. Les vaccins.....	38
2. 3. 9. Quelques modèles animaux.....	41
2. 3. 9.1. Le lapin.....	41
2. 3. 9. 2. Les ruminants.....	42
2. 3. 9. 3. Les porcs gnotobiotiques.....	43
2. 4. Principaux épisodes de toxi-infections à <i>E. coli</i> O157:H7.....	43
2. 4.1. Le bœuf haché.....	43
2. 4. 2. Les légumes.....	44
2. 4. 3. Les boissons et aliments acides.....	45
2. 4. 4. L'eau.....	45
2. 4. 5. Les viandes fermentées.....	46
2. 5. Les saucissons secs et demi-secs.....	47
2. 5. 1. Procédés de fabrication.....	48
2. 5. 1. 1. La formulation.....	49
2. 5. 1. 1. 1. Les ingrédients.....	50
2. 5. 1. 1. 2. Les ferments de maturation.....	51
2. 5. 1. 2. Le poussage.....	53
2. 5. 1. 2. La fermentation et le séchage.....	53
2. 6. Ligne directrice des agences réglementaires.....	54

2. 7. Études de validation	57
3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS : Article 1	61
Fadia Naim, Serge Messier, Linda Saucier, Gabriel Piette ² . A model study of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 survival in fermented dry sausages – Influence of inoculum preparation, inoculation procedure and selected process parameters. Journal of Food Protection. 66 (12): 2267-2275.....	
3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS. Article 2	96
Fadia Naim ¹ , Serge Messier ¹ , Linda Saucier ² , Gabriel Piette ² . <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in fermented-dry sausages: post processing <i>in vitro</i> digestion challenge. Applied and Environmental Microbiology. Soumis.....	
3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS. Article 3	126
Fadia Naim, Serge Messier, Alain Houde, Danielle Leblanc, Linda Saucier, Gabriel Piette. Shiga-like toxin production by sausage-borne <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in response to a post processing <i>in vitro</i> digestion challenge En préparation pour publication dans le Journal of Food Protection.	
4. DISCUSSION GÉNÉRALE	158
4.1. Étude modèle de la survie de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 dans le saucisson sec	159

4. 2. Analyse du risque associé à la consommation de saucisses contaminées par <i>E. coli</i> O157:H7	165
4. 3. Effets du stress du procédé de fermentation-séchage et de la digestion subséquente sur le pouvoir cytotoxique des cellules	171
5. CONCLUSIONS	177
6. BIBLIOGRAPHIE	181

LISTE DES TABLEAUX

Article 1**Table 1:**

Analysis of variance pertaining to the inactivation of *E. coli* O157:H7 during sausage production trials.....91

Table 2:

Combined effects of inoculation procedure and process parameters on reduction of *E. coli* O157:H7 population from initial level during production of fermented-dried sausages.....92

Article 3**Table 1:**

Time course of pH during digestion of sausages under dynamic conditions..... 152

Table 2:

Titration and cytotoxic effect of decimally diluted filtrates from TSBG-grown overnight cultures of *E. coli* O157:H7, 2 days postinoculation..... 153

Table 3:

Pathogen counts, Stx production, and cytotoxic effect on Vero cells monolayers in response to fermentation-drying and subsequent *in vitro* digestion.....154

LISTE DES FIGURES

Article 1**Figure 1:**

Survival of *E. coli* O157:H7 cells during a 6-h exposure to TSB acidified to pH 2.0 with concentrated HCl.....95

Figure 2:

Mean destruction of *E. coli* O157:H7 in fermented dry sausages, initially inoculated during formulation with low (ca. 5×10^4 CFU/g) and high (ca. 2×10^7 CFU/g) pathogen concentrations.....96

Article 2**Figure 1:**

Survival and/or growth of *E. coli* O157:H7 cells experimentally inoculated in dry sausage during an *in vitro* digestion challenge under static conditions.....123

Figure 2:

Survival of *E. coli* O157:H7 cells experimentally inoculated in dry sausage during an *in vitro* gastric challenge under dynamic conditions.....124

Figure 3:

Survival or growth of *E. coli* O157 in pancreatic juice following 30, 60, 90 and 120 min of prior exposure to gastric challenge under dynamic conditions.....125

Article 3**Figure 1:**

Amplification of *stx-I* and *stx-II* mRNA for the strains 5-1 and ATCC 43894 of *E. coli* O157:H7.....156

Figure 2:

Freshly seeded Vero cells incubated for 48 h in presence of filtrates from uninoculated sausages and TSBG-grown *E. coli* O157:H7 cells.....157

Figure 3:

Cytotoxic response by Vero cells incubated for 48 ± 2 h with filtrates from inoculated, digested and undigested sausages.....158

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

ADN : acide désoxyribonucléique

AE : attachement effacement

AGV : acides gras volatiles

AH : acid habituation

AMI : American Meat Industry

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AR : acid resistance

ARNc : acide ribonucléique cloné

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adenosine triphosphate

ATR : acid tolerance response

a_w : activité de l'eau

BCIG : 5 bromo-4-chloro-indoxy- β -D-glucuronide

BHI : brain heart infusion

BHIB : brain heart infusion broth

BRTF : Blue Ribbon Task Force

CDC : Centers for Disease Control

CFA : cyclopropane fatty acid

CH : colite hémorragique

CO₂ : dioxyde de carbone

CRIFS : Canadian Research Institute of Food Safety

CRP : cyclic AMP receptor protein

CT : cefixime tellurite

CTR : cefixime tellurite rhamnose

°C : degré centigrade

D : décimale

DAEC : diffusly adhering *E. coli*

Da : dalton

DI: dose infectieuse

dNTP: deoxy-nucleotide triphosphate

EaggcEC : enteroaggregative *E. coli*

EHEC : enterohemorrhagic *E. coli*

Ehly : *E. coli* hémolysine

EIEC : enteroinvasive *E. coli*

EPEC : enteropathogenic *E. coli*

ETEC : enterotoxigenic *E. coli*

ESP : *E. coli* secreted proteins

FeCl₃ : chlorure ferrique

G : gramme

GABA : acide γ -amino bu

tyrique

GAD : glutamate arginine décarboxylases

GB3 : globotritriaosylceramide

GB4 : globotetraosylceramide

h : heure

HACCP : hazard analysis and critical control point

HGMF : hydrophobic-grid membrane filter

H : P : ratio humidité sur protéines

HR : humidité relative

IgG immuno-globulines G

IgM : immuno-globulines M

IMS : immunomagnetic separation

K : kilogramme

Kb: kilo paires de bases

KCl : chlorure de potassium

Kgy: kilogray

LAB: lactic acid bacteria

LB: Luria-Bertani

LEE: locus of enterocyte effacement

log: logarithme

LPS: lipopolysaccharide

LT: thermo-labile

M: masse

MDa : mégadalton

min: minute

mm : millimètre

MUG : 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide

MPR : moisture protein ratio

NaCl : chlorure de sodium

NCBAP : National Cattlemen's Beef Association

NICHHD : National Institute of Child Health and Human Development

NO₂ : nitrite

NO₃ : nitrate

OMP: outer membrane protein

P: pression

Pb : paires de bases

PBS : phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PGEF : pulse gel electrophoresis

Ppm : partie par million

PTT: purpura thrombopénique thrombotique

RFCP: restriction fragment length polymorphism

SMAC: gélose au sorbitol MacConkey

SNC : système nerveux central

STEC: Shiga-like toxin producing *E. coli*

TSA: trypticase soya agar

µm: micromètre

UV: rayons ultraviolets

À mes trois anges...

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mon projet de doctorat. Chaque grain de sel comptait, et même un petit mot suffisait pour reprendre le souffle dans les moments les plus durs.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance au Dr Gabriel Piette pour m'avoir confié le projet, pour son professionnalisme, son ouverture d'esprit et surtout sa confiance et son support sans limite. Merci.

Je tiens également à remercier mon co-directeur, le Dr Serge Messier, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire, pour ses conseils judicieux, sa disponibilité, et sa gentillesse.

Je remercie également le Dr Alain Houde, du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments, qui m'a offert l'expertise et l'encadrement nécessaires pour la réalisation de la partie biologie moléculaire du projet, pour les corrections de l'article correspondant, et surtout pour le support moral et les conversations amicales qui m'a accordées.

Je tiens aussi à remercier le Dr Linda Saucier de l'Université Laval pour sa collaboration au projet, sa participation aux corrections des articles, et surtout pour son amitié appréciable.

Je tiens à adresser mes remerciements à Mme Danielle Leblanc pour avoir mis du cœur et de l'expertise pour obtenir les meilleures bandes de RT-PCR. Merci aussi pour sa compagnie agréable et pour toutes les bougies qu'elle a allumées!

Je tiens maintenant à remercier les personnes dont la participation a rendu possible la réalisation du projet notamment, Claude Leblanc pour l'encadrement technologique, Yves Raymond pour les analyses biochimiques de la viande, Michèle Lapointe et Josiane Lefebvre-Lavoie pour l'aide dans les grandes productions de saucisses et le contrôle de la qualité.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance infinie à mes parents, à ma famille, à ma belle-famille, à ma meilleure amie Marlène, et à tous ceux m'ont entourée par leur amour et leur support.

Finalement, les plus beaux mots au monde ne seront jamais assez pour remercier mes adorables Elie, Peter et David, la source de ma motivation et la joie de ma vie.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis son identification en 1982 comme agent étiologique de deux épidémies distinctes de diarrhée sanguinolentes, *Escherichia coli* O157:H7 s'est avéré comme un danger significatif pour la santé publique sur les continents Nord Américain et Européen. Durant les dernières décennies, cette bactérie a été associée à des cas sporadiques de diarrhée, de colite hémorragique (CH), de syndrome hémolytique et urémique (SHU) (une complication grave de la maladie se manifestant par une insuffisance rénale aiguë), et de purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT, complication avec des signes neurologiques). Les manifestations systémiques de l'infection sont reliées à la production de toxines très puissantes du type Shiga (Stx). Ces toxines gagnent la circulation sanguine et endommagent les glomérules rénaux et la microvasculature irriguant le côlon et le système nerveux central.

Bien que le bœuf haché soit principalement responsable de la transmission de *E. coli* O157:H7 aux humains, il n'en demeure pas moins que différentes sources alimentaires, provenant d'une variété d'industries agro-alimentaires, ont été associées à des épisodes de toxi-infections majeurs qui ont eu lieu entre autres aux Etats-Unis (Anonymous, 1993; Centers for Disease Control, 1993), au Canada (Anonymous, 1997-b), et au Japon (Michino *et al.*, 1998). Un épisode, qui est survenu en 1994 dans les États de Washington et de la Californie et dans lequel le salami sec a été identifié comme le véhicule de l'infection (CDC, 1995-a), a eu un impact majeur sur l'industrie de transformation des viandes. L'impact provenait de la nouvelle réglementation issue de l'agence gouvernementale américaine *United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service* (USDA-FSIS), et par la suite de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) (Santé Canada,

2000), qui a exigé des producteurs de saucisses fermentées de valider l'efficacité de leurs procédés de fabrication en regard de la destruction de *E. coli* O157:H7. Pour satisfaire aux exigences de la nouvelle réglementation, les procédés doivent réduire de $5 \log_{10}$ UFC/g le niveau de l'agent pathogène à partir d'un inoculum initial $\geq 2 \times 10^7$ UFC/g d'un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7, préalablement adaptées à l'acidité et introduites dans la mèche crue (Getty *et al.*, 2000; Nickelson *et al.*, 1996). Étant donné que les procédés de transformation des saucissons secs et demi-secs comportent de nombreuses variations, des études de validation ont été effectuées pour différents produits de charcuterie. Ces études ont permis de conclure que la fermentation et le séchage résultent en une destruction totale de 0.3 à 2.1 \log_{10} UFC/g (Calicioglu *et al.*, 2001; Faith *et al.*, 1998-a; Faith *et al.*, 1998-b; Hinkens *et al.*, 1996; Nissen et Holk, 1998; Riordan *et al.*, 1998). Pour atteindre les 5 \log_{10} UFC/g requis, les auteurs ont dû précéder le séchage par un traitement thermique allant jusqu'à 60 min à des températures situées entre 46 et 63°C (Calicioglu *et al.*, 1997; Calicioglu *et al.*, 2001; Chikthimmah *et al.*, 2001; Ellajosyula *et al.*, 1998; Getty *et al.*, 2000; Hinkens *et al.*, 1996). Toutefois, les effets généraux de facteurs spécifiques du procédé (température de fermentation, pH final, niveau de séchage...) sur le niveau de destruction de l'agent pathogène n'ont pas été clairement établis, en raison des différences dans les mélanges de souches, la formulation du produit, et les paramètres de fabrication dans les différentes études.

La majorité des études précédentes a été réalisée en suivant strictement la procédure du FSIS. Cependant, puisque les études de validation de procédés impliquent la contamination de l'aliment avec des agents pathogènes sous conditions contrôlées, les

mêmes considérations méthodologiques jugées importantes dans les études d'inoculation et emballage (pack inoculation studies) (Notermans *et al.*, 1993) telles que le choix des souches, la préparation de l'inoculum, la concentration de l'inoculum, et la procédure d'inoculation sont importantes dans les études de validation et méritent d'être prises en ligne de compte.

En plus des évidences épidémiologiques obtenues lors d'épisodes mettant en cause des aliments acides tels que le yaourt (Morgan *et al.*, 1993), le cidre de pommes (Besser *et al.*, 1993) et la mayonnaise (Weagant *et al.*, 1994), différents travaux de recherche ont démontré que *E. coli* O157:H7 est capable de survivre plusieurs heures dans des milieux fortement acides (pH inférieurs à 2.5) (Benjamin et Datta, 1995; Small *et al.*, 1994), et jusqu'à 3 h à pH 1.5 dans un suc gastrique artificiel (Arnold et Kaspar, 1995). Ces données ont permis de constater que la bactérie possède une faible dose infectieuse, qui serait due à sa capacité potentielle de tolérer le transit gastrique. Cependant, aucune des études précédentes n'a pris en considération l'influence des stress sous-létaux imposés par les techniques de préparation des aliments sur la capacité des cellules à résister au transit gastrique et sur le pouvoir cytotoxique des cellules ingérées avec les aliments contaminés.

En prenant compte de ce qui précède, le présent projet de recherche a été réalisé dans le cadre d'un programme d'étude général visant à évaluer la survie de *E. coli* O157:H7 dans le saucisson sec et à caractériser le risque associé à la consommation de saucisses contaminées. Plus particulièrement, le projet visait trois objectifs principaux : 1) Évaluer l'influence de la préparation de l'inoculum, de la procédure

d'inoculation et du niveau de l'inoculum initial sur la survie de *E. coli* O157:H7 durant la fabrication de saucisses sous différentes conditions de fermentation et de séchage; 2) Évaluer la tolérance des cellules stressées par le procédé de fermentation-séchage au transit gastro-intestinal simulé par un processus de digestion *in vitro*; 3) Évaluer l'effet du stress imposé par le procédé et la digestion subséquente sur le potentiel cytotoxique des cellules de *E. coli* O157:H7.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2. 1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un membre de la flore digestive normale des animaux à sang chaud. La colonisation par *E. coli* du tractus gastro-intestinal a lieu quelques heures ou quelques jours après la naissance, suite à l'ingestion de l'organisme dans les aliments, l'eau, ou par contact direct avec d'autres individus porteurs. Les cellules sont capables d'adhérer au mucus tapissant le gros intestin, où elles peuvent persister des mois ou des années (Todar, 1997).

2. 1. 1. Caractéristiques générales et sérotypie

E. coli appartient à la grande famille des *Enterobacteriaceae* (bactéries entériques), constituée de bactéries en forme de bâtonnet ($0.5 \text{ à } 1 \times 2 \text{ à } 6 \mu\text{m}$), à coloration Gram négative, à métabolisme anaérobie facultatif. Ces organismes fermentent le glucose et le lactose avec production de gaz et d'acides, et sont typiquement oxydase négatifs. Les souches mobiles produisent des flagelles péritriches.

E. coli est mésophile (7 à 48°C) avec une température optimale de croissance de 37°. L'organisme se développe à pH entre 4.4 et 9, tolère la présence de sels biliaires, une concentration de NaCl jusqu'à 6.5% (m/v), et une a_w (activité de l'eau) jusqu'à 0.95. L'organisme ne survit pas à la cuisson à une température de 65°C, à la pasteurisation à 72°C pendant 15 min, ni à l'irradiation à 3Kgy (Meng and Doyle, 1998).

Plus de 700 types antigéniques, ou sérotypes de *E. coli*, sont actuellement connus, mais seulement quelques sérotypes sont pathogènes pour l'homme et sont responsables de trois types d'infections: la méningite néo-natale, les infections du

tractus urinaire et les maladies intestinales ou gastro-entérites (Todar, 1997). Selon le système de sérotypie initialement décrit par Kauffmann, les *E. coli* étaient désignés par leurs trois antigènes de surface majeurs : l'antigène somatique O du LPS, H flagellaire, et K de la capsule. Dans le système actuel de sérotypie, seuls les antigènes O et H sont désignés pour identifier le séro groupe et le sérotype, respectivement (Todar, 1997).

2. 2. *Escherichia coli* entéropathogènes

Les souches responsables des maladies intestinales sont classifiées en six groupes spécifiques (ou pathotypes), se basant sur les propriétés de leur virulence, leurs mécanismes de pathogénie, les symptômes cliniques qui leur sont associés, et la sérotypie. Ces groupes comprennent les entérotoxinogènes (ETEC), les entéro-aggrégants (EaggEC), les entéro-invasifs (EIEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) entéropathogènes (EPEC), et entérohémorragiques (EHEC).

2. 2. 1. Les ETEC

Les souches ETEC sont une importante cause de la diarrhée infantile et de la « diarrhée des touristes » dans les pays sous-développés ou dans les régions où l'hygiène est déficiente (Doyle *et al.*, 1997). L'homme est le principal réservoir des souches ETEC. L'infection est acquise par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La maladie requiert la colonisation et l'élaboration d'une ou de plusieurs toxines thermostables (ST) et thermolabiles (LT). Les adultes dans les régions endémiques développent une immunité contre les infections à ETEC (Slayers et Whitt, 1994; Todar, 1997).

2. 2. 2. Les EaggEC

Les EaggEC sont associées à une diarrhée persistante chez les enfants. Elles se distinguent par leur adhérence agrégative aux cultures cellulaires. Les EaggEC ne sont pas envahissantes et ne produisent pas d'inflammation ou de modifications histologiques. Elles produisent une hémolysine et une toxine ST (EAST) dont le rôle dans la virulence est encore inconnu. D'ailleurs la signification des EAggEC comme agent de maladie humaine est encore controversée (Salyers et Whitt, 1994; Doyle *et al.*, 1997).

2. 2. 3. Les EIEC

Les EIEC se manifestent par une symptomatologie semblable à celle décrite pour la dysenterie causée par *Shigella*, soit une diarrhée sanguinolente et mucoïde, surtout chez les enfants de moins de cinq ans. Les EIEC ne produisent pas de ST ou LT, ni de Shiga toxine (contrairement à *Shigella*). Le caractère envahissant des souches est associé à des protéines de la membrane externe (OMP) portées par un plasmide de 140 MDa. Les EIEC pénètrent dans les cellules épithéliales du côlon, se multiplient et se dispersent d'une cellule à l'autre de façon latérale, causant l'inflammation des tissus et la mort cellulaire (Reitmyer, 1996; Todar, 1997).

2. 2. 4. Les DEAC

Ces souches peuvent produire une légère diarrhée, sans la présence de sang, ni de leucocytes. Elles n'élaborent pas de LT ni de ST, et ne sont pas envahissantes. Elles se distinguent par une adhésion diffuse caractéristique; elles couvrent la surface cellulaire de façon uniforme (Doyle *et al.*, 1997).

2. 2. 5. Les EPEC

Les EPEC sont la cause majeure de la diarrhée pédiatrique et de la mort des enfants dans les pays sous-développés (Salyers et Whitt, 1994). Ils causent une diarrhée aqueuse sévère souvent auto-guérisable, mais pouvant se compliquer en déshydratation et acidose. Les EPEC adhèrent à la muqueuse intestinale et causent un réarrangement des filaments d'actine, un processus appelé attachement et effacement (AE). Les EPEC produisent aussi une entérotoxine semblable à celle de *Shigella*, mais les symptômes de l'infection résultent probablement de l'invasion des cellules et de l'interférence avec les signaux de transduction (Todar, 1997).

2. 2. 6. Les EHEC

Au cours des années 1980, les EHEC sont devenues des pathogènes émergents lorsque des souches de *E. coli* appartenant au sérotype O157:H7 ont été associées à deux cas de colites hémorragiques. Bien que des dizaines de sérogroupes aient été identifiées jusqu'à date (O1, O2, O4, O5, O6, O18, O25, O26, O38, O39, O45, O50, O55, O82, O84, O91, O103, O111, O113, O114, O115, O117, O118, O121, O125, O126, O128, O145, O146, O153, O157, O163 et O165) (Reitmyer, 1996), le sérotype O157:H7 demeure la cause prédominante des maladies associées aux EHEC aux États-Unis et au Canada.

2. 3. *Escherichia coli* O157:H7

2. 3. 1. Caractéristiques générales

La majorité des réactions biochimiques de *E. coli* O157:H7 sont typiques de *E. coli* générique. Cependant, contrairement aux autres coliformes fécaux, la bactérie ne

fermente pas le sorbitol en 24 h, ne possède pas l'enzyme β -glucuronidase et se développe lentement à 45°C (Honish, 1986; Okrend *et al.*, 1990; Raghubeer et Matches 1990). Cette dernière caractéristique est importante compte tenu du fait que les tests standards de dépistage des coliformes fécaux exigent une incubation à 44 - 45°C.

Une des caractéristiques physiologiques clefs de *E. coli* O157:H7 est sa grande résistance à l'acidité de l'environnement (Meng et Doyle, 1998). Cependant, l'organisme démontre une résistance moyenne aux radiations ionisantes (1.08 kGy; Thayer et Boyd, 1993), et à la température, avec des valeurs $D_{52^{\circ}\text{C}} = 115$ min, $D_{57^{\circ}\text{C}} = 5.3$ min, $D_{63^{\circ}\text{C}} = 0.47$ min, mesurées dans le bœuf haché à 30% de gras (Doyle *et al.*, 1997).

2. 3. 2. Résistance à l'acidité

Les chercheurs ont pris connaissance de la résistance à l'acidité (AR) de *E. coli* O157:H7 suite à certains épisodes de toxi-infections alimentaires mettant en cause des aliments acides tels que le yaourt (Morgan *et al.*, 1993), le cidre de pommes (Besser *et al.*, 1993; Miller et Kaspar, 1994), la mayonnaise (Zhao et Doyle, 1994), et le saucisson sec (Centers for Disease Control and Prevention, 1995-a). Suite à ces incidents d'origine alimentaire, il a été démontré que la bactérie peut survivre jusqu'à 31 jours dans le cidre de pommes (pH 3.6 à 4.1) (Miller et Kaspar, 1994; Zhao *et al.*, 1993) et 55 jours dans la mayonnaise (pH 3.6 à 4.1) (Zhao et Doyle, 1994), selon la température d'entreposage et la présence ou l'absence d'agents de conservation.

L'ensemble des études de survie dans des milieux acidifiés a permis de conclure que *E. coli* O157:H7 dispose d'une résistance remarquable à l'acidité. La bactérie peut survivre plusieurs heures à pH 2.0 (Miller et Kaspar, 1994) dans un bouillon de trypticase soya acidifié par HCl. Leyer *et al.*, (1995) ont rapporté que la résistance de *E. coli* O157:H7 aux conditions d'acidité extrêmes (pH <3.0) est maximisée par une préadaptation à un pH modérément acide (pH 5), suggérant une AR pH-dépendante. Ceci n'a pas été corroboré par l'étude d'Arnold et Kaspar (1995) sur des cellules en phase stationnaire de croissance, dont l'AR (pH 2.0) ne dépendait pas d'une préexposition à l'acidité. Benjamin et Datta (1995) ont spécifié que l'AR était variable selon les souches et la phase de croissance, avec une résistance maximale observée chez les cellules de la phase stationnaire.

Dans une étude comparative impliquant sept souches, Buchanan et Edelson (1996) ont rapporté que les trois souches associées aux épisodes de toxi-infections majeures disposent probablement d'une résistance constitutive à l'acidité. Cependant, cherchant à déterminer l'incidence du phénotype sensible à l'acidité en utilisant 58 isolats de *E. coli* productrices de toxines Shiga (dont 38 appartenant au sérotype O157:H7), Waterman et Small (1996) ont montré que l'AR variait entre les différentes souches, indépendamment du sérotype ou de l'origine de l'isolat.

Les différentes stratégies et milieux utilisés ainsi que le choix des souches pour tester la survie à l'acidité peuvent être à l'origine de la controverse dans la littérature. Ceci a créé le besoin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'acidité de *E. coli* O157:H7 et les conditions pouvant les déclencher.

2. 3. 2. 1. Systèmes de résistance à l'acidité

Trois systèmes de résistance à l'acidité ont été identifiés chez les *E. coli* commensales et les EHEC, et aucun mécanisme additionnel n'a été découvert chez ces derniers. Comme chez *Salmonella*, les systèmes de survie de *E. coli* à l'acidité sont associés aux phases de croissance; certains protègent essentiellement les cellules de la phase log, alors que d'autres protègent celles de la phase stationnaire (Foster, 2000).

2. 3. 2.1.1. Systèmes associés à la phase log

La réponse de tolérance à l'acidité (ATR), exprimée aussi par *S. Typhimurium*, est induite par la croissance sous des conditions modérément acides. Elle protège les cellules de la phase log contre des conditions acides relativement sévères (pH 3.0) dans un milieu minimal ou complexe (Small *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). Il semble que la formation de l'acide gras cyclopropane (CFA) dans la membrane cellulaire soit extrêmement importante pour la survie des cellules au stress acide. Le rôle potentiel des CFA incluerait soit la réduction de la perméabilité membranaire aux protons, soit l'interaction avec des protéines membranaires qui influencent le trafic protonique (Chang et Cronan, 1999). Ceci a été renforcé par l'étude de Jordan *et al.* (1999), qui a démontré une forte corrélation entre l'augmentation de la résistance à l'acidité et la réduction de la perméabilité membranaire aux protons. L'étude a aussi démontré une corrélation entre le changement de la perméabilité de la membrane et l'altération de sa composition protéique qui, selon les auteurs, peut directement résulter du changement de la composition de la couche membranaire bilipidique.

L'accoutumance à l'acidité (AH): l'AH offre une courte protection (7 min) à pH 3.0 souvent effectuée dans un milieu complexe (Foster, 2000). Elle est affectée par la présence de plusieurs éléments tels que glucose, glutamate, aspartate, FeCl₃, KCl, et L-proline, qui peuvent induire une AH à pH neutre. L'AMPc aussi influence l'induction de l'AH (Rowbury et Goodson, 1998).

2. 3. 2.1.2. Systèmes associés à la phase stationnaire

Les cellules de la phase stationnaire sont 1000 à 10 000 fois plus résistantes à l'acidité que les cellules de la phase log (Gorden et Small, 1993; Small *et al.*, 1994). Trois systèmes, nommés résistance à l'acidité (AR), ont été identifiés chez *E. coli*: le système RpoS-dépendant, déclenché par le métabolisme d'oxydation et réprimé en présence du glucose; les systèmes glutamate-dépendant et arginine-dépendant activés par le métabolisme fermentaire (Foster 2000; Hersh *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995; 1996). Une étude comparative entre des souches commensales de *E. coli* et des souches cliniques de O157:H7 a montré peu de différence entre les deux groupes, à l'exception du fait que le système arginine-dépendant était plus robuste chez ces dernières (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). L'induction des systèmes dépend du type de milieu et des conditions de croissance.

Le système RpoS-dépendant: Lorsque les cellules bactériennes entrent en phase stationnaire, il y a un ralentissement, puis un arrêt de croissance. Des changements morphologiques et génétiques surviennent afin de prolonger la survie et augmenter la résistance aux différentes conditions de stress (Siegele et Kolter, 1992). Le régulateur central de l'expression des gènes de la phase stationnaire est le RpoS (ou facteur

sigma, σ^s), produit du gène *rpoS*. Les produits de plusieurs gènes régulés par *rpoS* protègent *E. coli* contre des conditions environnementales adverses telles que stress osmotique, épuisement de nutriments, stress de l'oxydation, et les radiations UV (Rees *et al.*, 1995). Le rôle du RpoS dans la résistance à l'acidité des cellules de la phase stationnaire a été mis en évidence chez *E. coli*, puisque les mutants ou les isolats défectifs en *rpoS*, ou portant un *rpoS* non fonctionnel, sont significativement plus sensibles aux conditions acides (Small *et al.*, 1994; Cheville *et al.*, 1996; Waterman et Small, 1996) que les isolats du type sauvage ayant un *rpoS* fonctionnel. Le système RpoS-dépendant protège les cellules pour plusieurs heures à pH 2.5 dans un milieu minimal, et à pH 2 dans un milieu complexe. Il est réprimé en présence de glucose (Lin *et al.*, 1995; 1996), puisque son expression requiert l'AMP cyclique (cAMP) et le CRP (protéine réceptrice du cAMP) (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Smith, 2003). Le système RpoS-dépendant est induit par l'entrée en phase stationnaire quel que soit le pH de croissance, mais un inhibiteur produit à pH 8 interfère avec l'activité (pas la synthèse) du système, donnant l'illusion d'une induction acide (Lin *et al.*, 1996 Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Cet inhibiteur peut être éliminé par centrifugation. L'induction du système RpoS-dépendant requiert la présence de glutamate (ou de glutamine) dans le milieu de croissance, mais son addition durant l'exposition à l'acidité n'a pas d'effet. Ce système est aussi retrouvé chez *Shigella flexneri* (Smith, 2003).

Le système glutamate- dépendant (GAD): ce système est induit en milieu minimal ou complexe, et il requiert des concentrations millimolaires de glutamate extracellulaire durant l'exposition aux conditions acides (Lin *et al.*, 1995). Le système utilise la

glutamate décarboxylase induite durant la croissance, et l'enzyme consomme les protons par décarboxylation du glutamate et production du GABA (acide γ -aminobutyrique). Le produit final sera par la suite exclu de la cellule en échange d'un nouveau substrat (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Le processus de transport est catalysé par un système d'antiport spécifique, le GadC. L'ensemble du système veille à ce que les protons qui s'infiltrent dans la cellule durant le stress acide soient consommés et excrétés de la cellule, empêchant ainsi le déclin du pH interne (pHi) à un niveau létal. Parmi les trois systèmes identifiés, le système glutamate-dépendant, assure le plus haut niveau de protection contre l'acidité et on le retrouve aussi chez *S. flexneri* (Foster, 2000).

Le système GAD chez *E. coli* comprend trois gènes. Deux de ces gènes, *gadA* et *gadB*, codent pour des glutamates décarboxylases homologues et partagent 98% d'identité au niveau de leurs séquences de nucléotides (Smith *et al.*, 1992). Le troisième gène, *gadC*, code pour l'antiport glutamate:GABA (Hersh *et al.*, 1996). Le gène *gadA* est monocystonique, mais les gènes *gadB* et *gadC* sont situés sur un opéron (Hersh *et al.*, 1996). L'une ou l'autre des deux décarboxylases est requise pour la protection à pH 2.5 en présence du GadC, mais les deux isoenzymes seront requis pour la survie à pH 2 (Castanie-Cornet *et al.*, 1999).

Le système GAD est principalement induit par un pH acide (LB + 0.4% glucose, pH 5.5) (Yoshida *et al.*, 1993), bien que les gènes *gadA* et *gadBC* soient partiellement induit par l'entrée en phase stationnaire (LB, pH 7). RpoS contrôle l'induction des gènes par la phase stationnaire, mais l'induction acide implique un régulateur

inconnu. L'expression de *gadA* est principalement affectée par un pH acide, tandis que l'expression de *gadB* est affectée par l'entrée en phase stationnaire (Castanie-Cornet *et al.*, 1999).

Le système arginine-dépendant: ce système utilise l'arginine décarboxylase (Lin *et al.*, 1995), le produit du gène *adiA*. L'enzyme convertit l'arginine en agmatine, consommant un proton durant le processus (Stim et Bennett, 1993). L'antiport de ce système n'a pas encore été identifié. L'expression optimale de *adiA* a lieu dans un milieu complexe, à pH acide et sous conditions d'anaérobiose. Le régulateur positif CysB est requis pour l'expression de *adiA* et pour l'AR gérée par ce système (Lin *et al.*, 1996; Shi et Bennett, 1994). Le système arginine-dépendant est un peu plus robuste chez les souches du sérotype O157:H7 (Foster, 2000) que les souches de *E. coli* commensales (Lin *et al.*, 1996). Ce système n'a pas été démontré chez *S. flexneri* (Smith, 2003).

2. 3. 3. Dose infectieuse

L'acidité des sécrétions gastriques est depuis longtemps connue comme une première ligne de défense contre les agents pathogènes d'origine alimentaires (Giannella *et al.*, 1972). Il est généralement accepté que la dose infectieuse (DI) orale des différents agents pathogènes entériques est reliée à leur capacité de résister aux conditions acides. Les DI de *Vibrio cholerae*, de *Salmonella* non-Typhi et de *Shigella flexneri*, par exemple, sont approximativement 10^9 , 10^5 et 10^2 organismes respectivement. Ces doses correspondent bien à l'AR relative de la bactérie, *Vibrio cholerae* étant la moins résistante et *Shigella flexneri* la plus résistante (Lin *et al.*, 1996). Se basant sur

des données épidémiologiques (Griffin et Tauxe 1991, Ralph et Giannella, 2003) et des études de survie (Benjamin and Datta, 1995), il a été conclu que *E. coli* O157:H7 possède une très faible DI, et que moins de 100 organismes ingérés sont capables de causer une infection chez l'homme.

2. 3. 4. Infection et manifestations cliniques

E. coli O157:H7 s'est révélée une cause importante de maladies entériques, spécialement dans les cas d'épidémies reliées aux établissements collectifs (cliniques, maisons de santé et garderies) et aux chaînes de restauration rapide (hamburgers). Le nombre de porteurs asymptomatiques de l'organisme est inconnu. Les manifestations cliniques de l'infection des voies gastro-intestinales commencent le plus souvent par une diarrhée, après une période d'incubation de 3 à 4 jours. La diarrhée est accompagnée par des nausées et des vomissements chez la moitié des malades, mais la fièvre est observée chez seulement le tiers. Dans certains cas, la maladie progresse en diarrhée sanguinolente et colite hémorragique (90% des cas), caractérisées par des crampes abdominales très sévères. Les symptômes se résorbent en général après une semaine du début de la diarrhée (Reitmeyer, 1996).

Parmi les complications intestinales de la maladie figurent l'invagination intestinale, la perforation du côlon, l'appendicite, et la pancréatite. Chez certains patients, la maladie progresse en SHU, une forme grave de la maladie caractérisée par une insuffisance rénale aiguë, une anémie hémolytique et une thrombocytopénie. Des manifestations neurologiques, tels que la somnolence, les convulsions, et le coma, peuvent aussi accompagner le SHU (Easton, 1997; Kerr, 1999; SCP, 2002). Bien que

le SHU puisse apparaître chez tous les groupes d'âges, son incidence est plus élevée chez les enfants de moins de 10 ans (10% des cas) et les personnes âgées (Reitmyer, 1996). Dix pour cent des patients ayant développé le SHU en meurent, et 30 % des survivants souffriront de séquelles permanentes telles que l'insuffisance rénale chronique, l'hypertension et des troubles neurologiques (Paton et Paton, 1998-b).

Le purpura thrombopénique thrombotique (PTT) est une autre complication plus commune chez les adultes. La maladie ressemble au SHU, mais les patients sont plus fréquemment fébriles et les symptômes neurologiques associés sont plus marqués (Paton et Paton, 1998-b).

2. 3. 4. 1. Histopathologie de l'infection

E. coli O157:H7 induit des lésions d'attachement effacement (AE) au niveau des cellules épithéliales du gros intestin similaires à celles induites par les EPEC, qui par contre ont lieu surtout au niveau de l'intestin grêle (Doyle, 1997; Salyers et Whitt, 1994). Les lésions AE sont cruciales pour le développement de la diarrhée, mais leur rôle dans la maladie est inconnu. Elles peuvent détruire la capacité d'absorption des villosités intestinales, ce qui mène à un déséquilibre ionique et une production de diarrhée (Kaper *et al.*, 1998-a).

Les lésions AE sont caractérisées par un attachement intime de la bactérie à la surface de la cellule eucaryote infectée, une destruction localisée des micro-villosités et une polymérisation d'actine et d'autres éléments du cytosquelette (Frankel *et al.*, 1998; Kaper *et al.*, 1998-a; b; Kresse *et al.*, 1998; Nataro et Kaper, 1998). Les lésions AE

peuvent être visualisées par microscopie électronique ou par coloration fluorescente de l'actine. Dans cette dernière technique, la phalloïdine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine se lie spécifiquement aux filaments d'actine accumulés directement en dessous de la bactérie adhérente (Knutton *et al.*, 1989).

2. 3. 5. Déterminants de virulence

2. 3. 5. 1. Locus d'effacement des entérocytes

Les gènes bactériens impliqués dans l'histopathologie des lésions AE sont localisés sur une région de 35 kb du chromosome bactérien nommée LEE pour « *Locus of Enterocytes Effacement* ». LEE a été retrouvé chez les EPEC et les EHEC (McDaniels *et al.*, 1995), mais il n'est pas présent chez les *E. coli* de la flore normale ou *E. coli* K-12. Ce grand fragment d'AND codant pour de multiples facteurs de virulence et absent chez les membres non pathogènes de l'espèce a été nommé îlot de pathogénicité (*pathogenicity island*). LEE porte les gènes codant pour l'intimine (*eae*) et son récepteur Tir (*tir*), les protéines responsables de l'induction de signaux de transduction dans la cellule hôte (*esp*), et le système de sécrétion du type III (*esc*) (Kaper *et al.*, 1998-b).

L'intimine est une protéine membranaire de 94-kDa (OMP) responsable de l'attachement intime de la bactérie aux entérocytes. L'utilisation de souches possédant une mutation au niveau du gène *eae* sur des modèles animaux a montré que cette protéine est requise pour la colonisation intestinale et la production de lésions AE au niveau du gros intestin de porcelet (Donnenberg *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1995; Tzipori *et al.*, 1995), de cerf (Dean-Nystrom *et al.*, 1998), de bovin, de mouton

et d'humain (Cornick *et al.*, 2000). L'intimine se lie spécifiquement à son récepteur Tir (translocated intimin receptor), une protéine de 78-kDa produite dans la bactérie et translocalisée dans la cellule eucaryote via le système de sécrétion du type III (De Vinney *et al.*, 1999; Kenny *et al.*, 1997).

L'intimine agit en synergie avec le système de sécrétion type III, qui sécrète les protéines EspA, B et D (*E. coli secreted proteins*) responsables de l'insertion de Tir dans la membrane cellulaire et des événements de transduction des signaux observés dans les lésions AE (Hueck, 1998; Kenny *et al.*, 1997). Le système de sécrétion type III est aussi appelé « site contact dépendant », car il est activé par le contact avec la cellule hôte. Il est composé de plusieurs protéines présentes dans les membranes interne et externe, et nécessite pour son activité une ATPase (pour l'énergie) et des translocases (Hueck, 1998).

2. 3. 5. 2. Les toxines

2. 4. 5. 2. 1. Nomenclature

E. coli O157: H7 produit une ou plusieurs toxines exerçant un effet cytolytique sur les cellules Vero, lignée des cellules rénales du singe africain vert, d'où vient la nomenclature originale VT1 et VT2 (Doyle *et al.*, 1997). La purification et la caractérisation de la VT1 ont démontré une similarité de structure et d'activité biologique avec la toxine Shiga (Stx), produite par *Shigella dysenteriae* type 1 (O'Brien et LaVeck, 1983), d'où la deuxième nomenclature Shiga-like toxin (SLT). Les termes VT et SLT ont été utilisés de façon interchangeable dans la littérature. Dernièrement, Calderwood *et al.* (1996) ont proposé que les toxines soient nommées

selon le prototype de la famille Stx, et c'est cette forme de nomenclature qui sera utilisée dans cet ouvrage.

2. 3. 5. 2. 2. Structure des Stx

La toxine, de 70 kDa, est composée d'une sous-unité catalytique A de 32 kDa associée à un pentamère de sous-unités B (7.7 kDa chaque monomère). La sous-unité B est impliquée dans la liaison de la toxine au récepteur glycolipidique spécifique de surface cellulaire, typiquement le globotriaosylceramide (Gb3) (Paton et Paton, 1998-b). Les études moléculaires indiquent que Stx-I diffère de Stx de *S. dysenteriae* type 1 par un seul acide aminé dans le polypeptide A, tandis qu'elle présente seulement 50 à 60 % d'identité à Stx-II (Sears et Kaper, 1996).

2. 3. 5. 2. 3. Génétique des Stx

Les gènes des Stx-I sont portés par les génomes de bactériophages lambdoïdes lysogènes et sont conservés parmi tous les isolats cliniques testés. Par contre, une hétérogénéité considérable existe parmi les gènes de la famille Stx-II, donnant naissance aux variantes Stx-IIc, Stx-IId et Stx-IIe que l'on retrouve chez les souches humaines et animales (Doyle *et al.*, 1997; Tesh *et al.*, 1993). Cette hétérogénéité, résultant probablement de recombinaisons génétiques parmi les gènes des sous-unités B (Doyle *et al.*, 1997), serait responsable de l'altération de l'affinité ou de la préférence pour le site de liaison. Par exemple, les sous-unités B de Stx-IIe la toxine responsable de la maladie d'œdème chez le porc, préfèrent le Gb4 au Gb3 comme récepteur fonctionnel (deGrandis *et al.*, 1989; Samuel *et al.*, 1990). Les gènes de Stx-II et des variantes Stx-II sont aussi portés par un bactériophage qui s'intègre dans le

chromosome de la bactérie, à l'exception de Stx-IIe dont les gènes sont portés sur le chromosome (O'Brien *et al.*, 1984; Paton et Paton, 1998-b).

Le séquençage des nucléotides des Stx-I et Stx-II montre que les opérons ont une structure commune qui consiste en une seule unité de transcription qui code en premier pour la sous-unité A, suivie des sous-unités B. Le gène de la sous-unité B possède un fort site de liaison aux ribosomes, ce qui résulte en une translation en plusieurs copies expliquant la structure 1:5 AB de la toxine (Habib et Jackson, 1993). La production de stx-I est négativement régulée au niveau de la transcription par un complexe protéique répresseur fer-Fur qui se lie au promoteur de Stx-I (Doyle *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1999). Le fer n'affecte pas l'expression des Stx-II, mais l'activité de certaines variantes de Stx-II augmente en présence du mucus intestinal (Melton-Celsa et O'Brien, 1996).

2. 3. 5. 2. 4. Internalisation et mode d'action des Stx

Les toxines de la famille Shiga agissent par inhibition de la synthèse protéique et sont considérées parmi les plus puissantes toxines bactériennes. Le pentamère des sous-unités B lie avec grande affinité la séquence trisaccharidique terminale du Gb3 (ou Gb4) (Sears et Kaper, 1996). Le complexe toxine-récepteur sera par la suite internalisé par endocytose pour former un endosome (Sandvig et Van Deurs, 1996). Dans certaines cellules, la vésicule se fusionne avec les lysosomes et la toxine sera dégradée (Paton et Paton, 1998-b). Par contre, dans les cellules particulièrement sensibles, l'endosome se dirige par un transport rétrograde vers l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique. Durant son trajet, la sous-unité A subit un clivage

par une protéase membranaire, la furine, générant ainsi les fragments A1 (28 kDa) et A2 (4.5 kDa) qui restent liés par un pont disulfide. Le pont disulfide sera par la suite réduit et le fragment A1 relâché dans le cytoplasme pour cibler les ribosomes (Popoff, 1998). Le fragment A1 possède une activité N-glycosidase capable de cliver un résidu adénine critique dans l'ARNr 28S des ribosomes 60S. Cette dépurination empêche la liaison facteur-1 dépendante du complexe aminoacyl-ARNt aux ribosomes, inhibant ainsi l'étape d'élongation de la chaîne peptidique. Ceci finit par inhiber la synthèse protéique et causer la mort cellulaire (Endo *et al.*, 1988; Popoff, 1998).

L'action des Stx cause aussi des dommages microvasculaires à l'intestin, ce qui permet aux toxines et à d'autres produits bactériens, tel que le LPS, de gagner la circulation sanguine. L'augmentation du niveau de médiateurs inflammatoires perturbe l'homéostasie des systèmes, endommage plusieurs types de cellules et induit la série de symptômes typique du SHU (Kanbar *et al.*, 2003).

2. 3. 5. 3. Plasmide pO157

Tous les isolats de *E. coli* O157:H7 portent un plasmide très conservé désigné pO157 (Schmidt *et al.*, 1994) de taille variant entre de 93.6 et 104 kb (Schmidt *et al.*, 1996). Le rôle du plasmide pO157 dans la pathogénèse de l'infection est inconnu. Des études l'ont associé à l'expression de fimbriae (Karch *et al.*, 1987), mais ces derniers ne semblent pas être impliqués dans l'adhérence du pathogène aux cellules épithéliales (Junkins et Doyle, 1989; Toth *et al.*, 1990; Tzipori *et al.*, 1987; Tzipori *et al.*, 1989). Récemment, il a été démontré que le plasmide pO157 code aussi pour une entérohémolysine, EHEC-hémolysine (EHEC-hly) (Schmidt *et al.*, 1995) et pour une

catalase-péroxydase (Brunder *et al.*, 1996), dont la fonction dans la pathogénie est encore inconnue.

L'EHEC-hly appartient à la famille des toxines RTX, (Bauer et Welch, 1996), dont les membres sont exprimés par les *E. coli* uropathogènes, *Pasteurella haemolytica*, et d'autres agents pathogènes d'origine humaine et animale. C'est une protéine membranaire de 60 kDa, cytolytique par formation de pores, caractérisée par de petites zones d'hémolyse turbides, ayant lieu après 18 à 24 h d'incubation à 37°C. Son action est détectable seulement sur les géloses au sang contenant des érythrocytes défibrinés et lavés (Beutin *et al.*, 1996; Karch *et al.*, 1998). L'EHEC-hly est exprimée *in vivo* au courant de l'infection à *E. coli* O157:H7 (Schmidt *et al.*, 1995), mais son rôle exact dans la pathogénie reste spéculatif. Il semble que la lyse des érythrocytes par cette hémolysine serve comme source de fer aidant à la croissance bactérienne (Nataro et Kaper, 1998).

Deux autres hémolysines, Ehly1 et EHly2 dont les gènes sont portés par des phages, ont été rapportées chez les STEC (Beutin *et al.*, 1993; Stroeder *et al.*, 1993). Toutefois, aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'expression *in vivo* de ces hémolysines, ni sur leur rôle dans la pathogénie de la maladie.

2. 3. 6. Réservoir et transmission

Les ruminants et particulièrement les bovins sont considérés comme le principal réservoir de *E. coli* O157:H7. Le taux porteurs sains chez les bovins est très variable, généralement 5 à 20% (Anonymous, 2001). Dans l'État de Washington, l'incidence

de l'agent pathogène dans les troupeaux de 60 fermes laitières variait entre 8.3 à 16 % (Doyle *et al.*, 1997). Au Canada, une source récente (Anonymous, 2002-a) a rapporté que 40% des 14 millions bovins sont présumés porteurs de *E. coli* O157:H7. Les variations dans l'incidence rapportée de la bactérie dépendent de la sensibilité de la technique utilisée pour la détection fécale et du fait que l'excrétion fécale de la bactérie est fréquemment intermittente et relativement de courte durée (quelques semaines). Elle est plus importante dans les saisons chaudes (Hancock *et al.*, 1997). La colonisation de l'animal persiste typiquement pendant moins de trois mois et les bovins juvéniles (2 à 24 mois) sont plus susceptibles à la colonisation que les bovins adultes (Whipp *et al.*, 1994).

En plus de l'espèce bovine, la bactérie a été isolée chez les chevaux, les chiens, les oiseaux, (Hanckock *et al.*, 1998) les moutons (Kudva *et al.*, 1996), le daim (Keene *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1995), les humains (Armstrong *et al.*, 1996) et dans l'eau (Faith *et al.*, 1996).

Les *E. coli* O157:H7 sont excrétées dans les fèces. L'homme et les animaux, qu'ils soient malades ou porteurs sains, sont les principaux agents de dissémination de l'organisme. La contamination des produits d'origine animale par les fèces se fait principalement durant l'abattage (Delazari, 1998). Les matières fécales répandues dans l'environnement étaient aussi la source de contamination de produits d'origine non-animale qui ont été associés à des épisodes de toxi-infections, notamment des pommes ayant servi à la production de cidre artisanal (Miller et Kaspar, 1994), des

pousses de radis, des salades (Feng, 1995) et de l'eau (Anonymous, 2000; Keene *et al.*, 1994),.

Bien que l'ingestion d'aliments contaminés constitue la principale source d'infection par *E. coli* O157:H7, avec 66% des cas rapportés aux États-Unis, le contact interpersonnel (20%), l'eau potable (8%) et l'eau de baignade contaminée (4%), et le contact direct avec les animaux et leurs déjections, notamment les bovins (2%), ont aussi été identifiés comme moyens de dissémination de l'infection humaine (Griffin, 1998).

2. 3. 7. Identification et typage

Plusieurs méthodes ont été développées pour la détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments et les échantillons cliniques. Ces méthodes peuvent être divisées en trois catégories : i) utilisation de caractéristiques phénotypiques spécifiques de l'organisme, ii) détection des toxines, des gènes de toxines ou d'autres déterminants de virulence; iii) sous-typage moléculaire (empreinte génomique).

2. 3. 7. 1. Méthodes basées sur les caractéristiques phénotypiques

La majorité des laboratoires utilisent la technique d'étalement sur géloses sélectives et différentielles avec ou sans étape d'enrichissement. Les milieux les plus communément utilisés sont la gélose MacConkey avec sorbitol (SMAC) (Vernozy-Rozand, 1997), SMAC additionné de cefixime et de tellulrite (CT-SMAC) (Zadic *et al.*, 1993) et CT-SMAC additionné de rhamnose (CTR-SMAC) (Kerr, 1999). Les raisons justifiant l'utilisation de ces milieux sont l'incapacité de la bactérie de

fermenter le sorbitol (Honish, 1998) et le rhamnose durant 24 h, et sa tolérance relativement élevée pour le cefixime et le tellurite par rapport aux autres coliformes et bactéries entériques telles que *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp. et *Hafnia alvei*.

Une autre caractéristique phénotypique de l'organisme a été exploitée, l'absence de l'activité β -glucuronidase. L'addition du substrat 5 bromo-4-chloro-indoxy- β -D-glucuronide (BCIG) au SMAC permet de sélectionner les colonies blanches de *E. coli* O157: H7 (sorbitol négatives et β -glucuronidase négatives) parmi les autres colonies bleues-vertes correspondant aux organismes sorbitol négatif et β -glucuronidase positifs (Okrend *et al.*, 1990). De même, Thompson *et al.*, (1990) ont développé un test fluorogénique rapide utilisant le 4-methylumbelliferyl- β -D-glucunoride (MUG) comme indicateur qui, lorsque hydrolysé par l'enzyme, génère un produit fluorescent lors de l'exposition à la lumière UV.

Les colonies suspectes poussant sur les milieux sélectifs et différentiels doivent être caractérisées par des tests d'agglutination utilisant des antisérums commerciaux contre les antigènes O157 ou H7. En raison des réactions croisées entre l'antigène O157 et d'autres sérotypes de *E. coli* ou d'autres entérobactéries, une caractérisation additionnelle par des tests biochimiques s'impose.

Un problème associé à l'utilisation des milieux sélectifs est leur faible performance pour la détection des cellules stressées. McCleery *et al.*, (1995) ont proposé l'incorporation d'une étape de ressuscitation de 2 h à 25°C sur la gélose trypticase

soya (TSA), suivie d'un recouvrement (overlay) par un milieu SMAC-MUG refroidi (45°C). Ceci améliore la détection des cellules stressées par la chaleur sur le milieu SMAC-MUG. D'un autre côté, Rocelle *et al.*, (1995) ont montré une meilleure performance du milieu éosine bleu de méthylène modifié par rapport au milieu SMAC en ce qui a trait à la survie des cellules de *E. coli* O157:H7 stressées par la chaleur et la congélation.

La sensibilité des techniques de détection par étalement sur gélose peut être aussi améliorée par l'utilisation de la séparation immunomagnétique (IMS) (Karch *et al.*, 1996; Kerr, 1999). L'IMS est une technique rapide de séparation et de concentration qui s'est avérée surtout utile pour l'isolement des agents pathogènes contaminant les matrices alimentaires. La technique utilise des billes magnétiques portant des anticorps spécifiques contre un organisme ciblé (contre l'antigène O157 dans le cas de *E. coli* O157:H7) (Anonymous, 1998). L'organisme est lié aux particules magnétiques, et le complexe sera séparé du système par application d'un champ magnétique (Warburton, 2003). La suspension subséquente dans un petit volume permettra de concentrer les cellules isolées et d'augmenter ainsi la sensibilité de la technique de détection.

Les techniques de détection par culture et par séparation magnétique sont spécifiques au sérotype O157 et ne permettent pas la détection d'autres sérotypes de *E. coli* productrices de Stx, qui se révèlent de plus en plus impliqués dans des cas d'entérocrites hémorragiques (O4, O11, O26, O45, O86, O104, O145) ou de SHU (O157:H-, O6:H11, O86, O103:H2, O111:H-, O119). La détection de ces STEC par

culture devient problématique puisque, à part la production de vérotoxines, elles ne possèdent pas de caractéristiques biochimiques, sérologiques ou morphologiques permettant de les distinguer des souches commensales.

Un autre test phénotypique, basé sur la sensibilité des souches de *E. coli* du sérotypes O157:H7 à la lyse par une batterie de bactériophages connus, a été développé au Canada (Ahmed *et al.*, 1987) pour les études épidémiologiques. Le typage par phage (phagotypie ou lysotypie), est actuellement répandu dans quelques centres, particulièrement au Canada et en Grande-Bretagne. Le test utilise 16 phages et reconnaît actuellement plus de 80 lysotypes (Frost *et al.*, 1989, 1993; Khakhria *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 2002). Étant donné que la majorité des souches isolées appartient aux lysotypes 1, 2, 4 et 49, il est donc nécessaire de combiner les résultats de typage à d'autres tests (Vernozy-Rozand, 1997) pour confirmer l'identité des isolats.

2. 3. 7. 2. Méthodes basées sur la détection des toxines, des gènes de toxines ou d'autres déterminants de virulence

Les toxines sont détectées de façon routinière par leur effet cytotoxique sur les cellules Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Le filtrat de culture est ajouté à une monocouche confluite de cellules Vero dans des plaques de culture. L'observation, par microscopie inversée (1 à 4 jours à 37°C et 5% CO₂), d'un arrondissement et d'un détachement cellulaire est un indicateur de la présence de toxines Stx. Cette approche permet la détection de toutes les bactéries productrices de Stx, et n'est pas spécifique au sérotype ou à l'espèce. Des tests de neutralisation utilisant des antisérums contre VT1 et VT2 seront nécessaires pour confirmer si l'effet cytotoxique est dû à la

présence de Stx (Scotland *et al.*, 1988). Des trousse de détection utilisant des anticorps monoclonaux contre Stx-I et Stx-II sont disponibles commercialement (Kerr, 1999).

D'autres approches visent la détection des déterminants de virulence, tels que les gènes *stx1*, *stx2* (Karch et Myer, 1989; Todd *et al.*, 1999), et *eae* (Jerse *et al.*, 1990), par lyse des colonies bactériennes et hybridation de l'ADN avec des sondes de nucléotides spécifiques. La filtration des cultures présumées positives à travers des membranes hydrophobes (HGMP) avant de les cultiver sur le milieu sélectif augmente la sensibilité de ces techniques (Todd *et al.*, 1999). Elle est particulièrement utile pour les échantillons alimentaires ou fécaux.

Les tests de PCR (*polymerase chain reaction*), simples ou multiplexes, et de RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*) sont des techniques plus sensibles destinées généralement à la détection non-quantitative de gènes de virulence et de leur ARNm, respectivement. La rapidité de ces techniques les rend utiles pour des applications d'analyses à grande échelle.

Les PCR et le PCR multiplexe sont utilisés pour l'amplification d'un ou de plusieurs segments d'ADN situés entre deux régions de séquences connues. Généralement, chaque segment correspond à une séquence conservée d'un gène codant pour un facteur de virulence, ex. *stx-I* et *stx-II* pour les Stx1 et Stx-II respectivement, *eaeA* pour l'intimine et son récepteur, *hlyA* pour l'hémolysine, et *rfb* pour l'antigène O (Paton et Paton, 1998-a; Read *et al.*, 1992; Venkateswaran *et al.*, 1997). Deux

oligonucléotides sont utilisés comme amorces pour une série de réactions synthétiques catalysées par l'ADN polymérase. Ces nucléotides ont typiquement des séquences différentes et sont complémentaires de séquences situées sur des brins d'ADN opposés délimitant le segment d'ADN à amplifier. Chaque cycle d'amplification comprend une étape de dénaturation thermique de l'ADN en présence des nucléotides et des quatre dNTP, une étape de recombinaison des amorces avec les séquences complémentaires d'ADN, et une étape d'extension par action d'enzyme ADN polymérase thermostable. Le cycle est répété plusieurs fois et chaque cycle double la quantité du produit d'ADN désiré. Les segments amplifiés sont séparés selon leur taille, calculée en paires de bases (pb), par migration sur un gel (ex. agarose) sous l'effet d'un champ électrique (électrophorèse). Les bandes sont visualisées par rayonnement UV après coloration (ex. bromide d'éthidium) (Veilleux, 2001). Dans le cas de PCR multiplexe, les différents segments sont distingués selon leur taille après migration et coloration (Paton et Paton, 1998-a).

Étant donné que l'ADN persiste après la mort cellulaire, la détection de l'ARNm par RT-PCR serait à la fois un marqueur de survie et d'expression des gènes (McIngvale *et al.*, 2002). Par action de la transcriptase inverse (d'origine virale) l'ARNm est transcrit en ADN. L'étape de transcription inverse sera suivie d'un PCR tel que décrit ci-haut. Un des problèmes du RT-PCR est la possible contamination par l'ADN qui nécessite un traitement à la DNase. De plus, cette technique requiert un espace de travail exempt de RNase, et du personnel qualifié. Des séquences oligonucléotidiques des amorces spécifiques ainsi que des troussees commerciales complètes de PCR et de RT-PCR sont disponibles sur le marché.

Récemment, Sharma (2002) a élaboré une technique de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *E. coli* O157:H7 et d'autres sérotype de *E. coli* entérohémorragiques dans le bœuf et les fèces bovines, en se servant de la présence des gènes *stx* et *eae*. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent (*reporter*) pendant sa réaction avec un indicateur de la production des amplicons. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de surveiller la réaction PCR durant la phase exponentielle où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Dorak, 2003, Poitras et Houde, 2002). Cette technologie est particulièrement intéressante pour l'analyse quantitative de l'expression génétique.

2. 3. 7. 3. Méthodes basées sur le sous-typage moléculaire

Dans les enquêtes épidémiologiques, des tests supplémentaires sont requis afin d'établir ou d'exclure les liens entre les différents isolats cliniques ou alimentaires de *E. coli* O157:H7. Les techniques de sous-typage moléculaire permettent de créer et de comparer les profils moléculaires des isolats, et de déterminer s'il s'agit de la même souche ou de souches différentes. Ces tests génotypiques sont réalisés uniquement dans les laboratoires de référence. Ils comprennent :

Analyse de plasmides: Ce test n'est pas unique au sérotype O157:H7, mais il permet d'identifier les souches productrices de Stx impliquées dans une poussée de cas ou dans des cas sporadiques d'infection. Cependant, il semble que tous les groupes de *E.*

E. coli O157 portent un plasmide d'à peu près 90 kb, et seulement une faible proportion de souches portent des plasmides additionnels (Frost *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2002).

Analyse des gènes *stx* (ou *stx*): Les variantes des Stx-I et Stx-II sont détectées par PCR (Piérard *et al.*, 1997; Tyler *et al.*, 1991), en utilisant des sondes d'oligonucléotides basées sur des séquences du gène de la sous-unité B ou par séquençage de l'ADN (Smith *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 1991).

Électrophorèse sur gel à champ pulsé (PFGE): C'est une méthode très discriminante et d'usage très répandu, surtout pour les études épidémiologiques. Dans cette technique, l'ADN génomique est digéré par des endonucléases (e.g. *XbaI* et *AvrII*) produisant des fragments de grande taille, afin d'établir le profil de restriction des souches (Böhm et Karch, 1992; Krause *et al.*, 1996; Willshaw *et al.*, 1997).

Analyses RFLP: La technique RFLP est basée sur l'hybridation de l'ADN génomique des *E. coli* O157 avec des sondes d'ADN marquées provenant d'un phage codant pour Stx-II (Smith *et al.*, 2002). Une autre RFLP, développée par Samadpour *et al.*, (1993), a été utilisée pour l'étude des cas qui sont survenus dans les États de l'ouest américain. Cette technique utilise comme sondes l'ADN marqué du phage λ , en raison de l'homologie observée entre λ et le phage codant pour VT2. La technique est utile pour les études épidémiologiques de *E. coli* O157 et non-O157.

2. 3. 8. Traitement de l'infection

Les stratégies thérapeutiques pour les patients présentant des symptômes suite à l'infection par *E. coli* O157:H7, ou autres *E. coli* productrices de Stx, visent les objectifs suivants: 1) réduire la sévérité et la durée des symptômes, 2) empêcher les complications telles que le SHU et PTT, 3) empêcher la transmission de l'infection.

2. 3. 8. 1. Les antibiotiques

L'antibiothérapie doit théoriquement satisfaire aux trois objectifs mentionnés plus haut. Or, son rôle dans le traitement de la maladie demeure obscur. Dans le premier rapport décrivant *E. coli* O157:H7 comme agent étiologique d'une épidémie de colite hémorragique (Riley *et al.*, 1983), les patients traités et non traités aux antibiotiques n'ont montré aucune différence concernant la durée des symptômes. Aucun des patients n'a développé le SHU ou d'autres formes de complications. D'autres rapports soutiennent aussi que l'antibiothérapie ne semble pas affecter la sévérité de la maladie (Cimolai *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1995). Par contre, le traitement antimicrobien a été associé à un taux élevé de mortalité dans une épidémie survenue au Canada (Carter *et al.*, 1987) et à une prolongation de la phase de diarrhée sanglante dans une surveillance de la maladie à travers l'État de Washington (Ostroff *et al.*, 1989-a). Par contre, Tadeka *et al.*, (1993) ont rapporté que l'administration de médicaments durant les trois premières journées après l'apparition des symptômes a réduit le risque de progression de la diarrhée sanglante en SHU. L'utilisation d'antibiotiques a aussi mené à des conclusions contradictoires dans deux grands épisodes d'infection à O157:H7 survenus en Écosse et au Japon en 1997.

Une façon par laquelle le traitement par des agents antimicrobiens peut aggraver la maladie serait par la lyse bactérienne et le relâchement des toxines préformées dans le cytoplasme, augmentant ainsi la disponibilité des toxines pour une absorption systémique subséquente (Kanbar *et al.*, 2003). La localisation des gènes *stx* (majoritairement sur le génome du bactériophage lambdaïde intégré) peut être aussi impliquée dans la pathogénèse de la maladie, lors des traitements avec des antibiotiques. Certains agents antimicrobiens, par exemple les quinolones et le triméthoprim, sont de puissants inducteurs de la réponse SOS (mécanisme bactérien de régulation génétique activé en réponse à l'endommagement de l'ADN) et induisent, de ce fait, une forte expression des gènes du bactériophage. Les gènes *stx* sont co-exprimés avec les gènes du phage et la production de toxine augmente considérablement à l'intérieur de 2 à 4 h (suivant le traitement). À la fin du processus, la toxine est relâchée par la bactériolyse, résultant de la production des particules phagiques (Kimmitt *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2001).

Au manque d'évidence quant à l'utilité des antibiotiques, vient s'ajouter un taux considérable de résistance aux antibiotiques parmi les isolats de *E. coli* O157:H7. Ainsi, un traitement empirique au moyen d'un médicament inapproprié risque de sélectionner les souches pathogènes au dépend des souches inoffensives de la flore normale du tube digestif (Cordovez *et al.*, 1992; Schroeder *et al.*, 2002).

Depuis la découverte de *E. coli* O157:H7 comme agent pathogène pour l'homme en 1982, il persiste une incertitude concernant l'utilité des antibiotiques. Des recherches cliniques seront nécessaires afin de trouver des réponses conclusives à plusieurs

questions. Est-ce que l'antibiothérapie devrait-êre appliquée? Si oui, comment et à quel moment de l'infection? Quel serait l'antibiotique le plus efficace? Est-ce que l'antibiothérapie prophylactique pour les porteurs asymptomatiques peut limiter la propagation de l'infection? Mais la sévérité de la maladie rend toutefois les essais cliniques difficiles.

2. 3. 8. 2. Les antipéristaltiques

L'utilisation des antipéristaltiques est contre-indiquée puisqu'elle peut prolonger le temps de séjour des Stx dans les intestins, et ainsi augmenter le risque de l'absorption systémique (Société Canadienne de Pédiatrie, 2002; Reitmeyer, 1996). D'ailleurs, des études rétrospectives ont démontré que l'administration de ces agents aux patients infectés avec O157:H7 a prolongé la durée de la diarrhée sanglante et augmenté le risque de développement de SHU (Cimolai *et al.*, 1994).

Tel que mentionné plus haut, les Stx lient avec grande affinité la séquence trisaccharidique terminale du Gb₃ (Gb₃; Gal α [1→4]Gal β [1→4]Glc-ceramide). Une stratégie thérapeutique exploitant la spécificité et la force d'interaction entre les Stx et leur récepteur glycolipide a été développée. Armstrong *et al.*, (1991) ont démontré que le synsorb-pk, composé d'un glycoside synthétique Gb₃ (Gal α [1→4]Gal β [1→4]Glc-) lié de façon covalente à des particules siliconisées, est capable de neutraliser Stx-I et Stx-II. Les auteurs ont proposé que synsorb-pk, lorsque administré au début de la diarrhée, neutralise la majeure partie de la toxine dans la lumière intestinale, limitant ainsi son absorption systémique et le développement du SHU. Jusqu'à

présent, le synsorb-pk n'est pas approuvé par les agences réglementaires comme traitement efficace contre le SHU causé par les Stx (Rogers, 2000).

À l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement connu qui peut arrêter la progression de la maladie. Les traitements appliqués consistent surtout en mesures de soutien et visent à alléger les symptômes immédiats et à prévenir les complications. Si la présence de SHU est soupçonnée, l'hospitalisation est recommandée. Il faut éviter l'hyperhydratation, car elle peut entraîner une hyponatrémie, des œdèmes pulmonaires et des problèmes cardiaques (Société Canadienne de Pédiatrie, 2002). L'administration prudente de solutés pendant les périodes d'oligurie ou d'anémie est actuellement recommandée pour aider à maintenir le niveau de fluide et d'électrolytes. Le traitement de l'hypertension est souvent nécessaire. La transfusion sanguine (globules rouges empaquetés) est parfois pratiquée pour compenser la destruction des globules rouges par l'hémolyse. Les complications neurologiques, tels que les convulsions, doivent être maîtrisées (Anonymous, 1999).

La dialyse, de préférence péritonéale, est recommandée chez les patients développant des symptômes d'urémie ou d'insuffisance rénale non-contrôlables par les méthodes conventionnelles. L'usage judicieux de la dialyse a réduit le taux de mortalité chez les cas de SHU de 100 % à <10 %. Les manifestations extra-rénales sont actuellement la principale cause de mortalité et de morbidité chez les patients intoxiqués ou ayant développé le SHU (Milford, 1992; Thomson, 1992; Trompeter *et al.*, 1983).

2. 3. 8. 3. Les vaccins

En raison de l'incertitude quant à l'utilisation des agents antimicrobiens, les intérêts se sont concentrés sur le développement de vaccins. Deux options se présentent, la vaccination des humains ou l'immunisation des bovins.

L'immunoprophylaxie impliquerait une immunisation active des personnes à risque afin de réduire l'incidence de l'infection et/ou de limiter la progression de la maladie. Une des approches populaires dans le développement de vaccins est l'utilisation de vaccins vivants atténués. Butterton et Calderwood (1998) ont construit un vecteur vivant atténué de *Vibrio cholerae* exprimant la sous-unité B de Stx-I. Les lapins vaccinés par voie orale ont produit des anticorps IgG capables de neutraliser Stx-I. Les auteurs ont par la suite construit un plasmide portant les gènes *eae* et *StxB1*. Le plasmide était instable, il produisait une faible quantité de StxB1 *in vitro*, et ne stimulait pas de réponse anticorps anti-EaeA (ou intimine).

Un vaccin conjugué liant un polysaccharide spécifique de la capsule de *E. coli* O157:H7 à une toxine inactivée génétiquement provenant de *Pseudomonas aeruginosa* est actuellement en phase expérimentale (Anonymous, 2002-b). Dans les essais cliniques, les volontaires ont produit des anticorps à une quantité assez élevée pour tuer la bactérie en culture. À part une réaction cutanée au site de l'injection développée par certains vaccinés, aucun effet secondaire sérieux n'a été signalé. Des essais cliniques additionnels seront nécessaires avant pouvoir commenter l'efficacité et la sécurité du vaccin.

L'immunothérapie passive est une autre stratégie pouvant être exploitée afin de prévenir la progression de la maladie en SHU ou TTP. Mukherjee *et al.*, (2002) ont récemment développé des anticorps monoclonaux humains contre la Stx-I en utilisant des souris HuMAB-Mouse (Medarex), contenant un transgène portant des loci pour des immunoglobulines humaines. Des IgG et des IgM spécifiques de la sous-unité B ont réussi à neutraliser l'effet cytotoxique de Stx-I purifiée sur les cellules Hela. Dans des essais *in vivo*, l'administration de HuMAB a augmenté à plus de 10 jours l'espérance de survie des souris contaminées (comparé à 3 à 4 jours pour les souris ayant reçu du PBS) subséquemment injectées par voie intraveineuse avec la toxine purifiée (Mukherjee *et al.*, 2002). Dans le cadre de la même étude, les auteurs ont développé des anticorps monoclonaux (HuMAB) contre les sous-unités A et B de Stx-II. Ces HuMAB prévenaient le développement des signes neurologiques et des lésions cérébrales associés à l'activité de Stx-II chez le porcelet. Les HuMAB dirigés contre la sous-unité B se lient à la toxine absorbée et l'empêchent d'accéder aux cellules endothéliales, alors que les HuMAB dirigés contre la sous-unité A agissent soit en prévenant l'inactivation ribosomale ou en masquant le récepteur. Les auteurs s'attendent à ce que les HuMAB soient efficaces à prévenir le développement du SHU chez les humains.

Une stratégie innovatrice, ayant théoriquement plusieurs avantages du point de vue santé publique, vise à gérer le problème au niveau du réservoir animal, le bovin. Des chercheurs (Anonymous, 2002-a) de l'Université de Guelph, en collaboration avec la division de la salubrité des aliments de la compagnie «Bioniche Life Science», ont développé un vaccin stimulant la production d'anticorps capables de prévenir

l'attachement de la bactérie à la paroi intestinale du bovin. Les études préliminaires ont montré 90 % de réduction de *E. coli* O157:H7 dans les fèces des bovins vaccinés comparés à celles des sujets non vaccinés. Le vaccin est administré par voie sous-cutanée au niveau de l'épaule de l'animal et ne semble pas causer d'effets secondaires. Les études sont en cours afin de s'assurer de la sécurité et de l'efficacité du vaccin.

2. 3. 9. Quelques modèles animaux

Les modèles animaux des maladies causées par *E. coli* O157:H7, et d'autres *E. coli* productrices de Stx, ont énormément contribué à la compréhension de la pathogénie et de l'histopathologie de la colite hémorragique et du SHU chez l'homme. Plusieurs espèces animales ont servi à cette fin. Chaque espèce avait ses avantages et ses inconvénients du point de vue disponibilité, coût, facilité de manipulation et similarité des lésions avec la maladie chez l'homme. Mais, chose certaine, chaque modèle a fourni et continue de fournir d'importants indices pour la prévention, le contrôle et le traitement de l'infection.

2. 3. 9. 1. Le lapin

Des lapins âgés de 5 à 10 jours constituaient le premier modèle animal dans lequel l'infection par *E. coli* O157:H7 a induit une diarrhée. La bactérie s'attachait préférentiellement aux cellules de la muqueuse épithéliale du côlon, où elle induisait des lésions d'AE. L'inoculation de segments de l'intestin grêle a été aussi utilisée comme modèle pour le SHU et les lésions histopathologiques associées (Moxley et Francis, 1998).

Les lapins ont aussi servi de modèle pour l'absorption systémique et l'action des Stx. Les toxines administrées par voie intraveineuse sont absorbées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du tractus gastro-intestinal et du SNC, causant ainsi la nécrose vasculaire, la thrombose et l'infarctus. Lorsque les Stx sont injectées par voie intraveineuse, elles causent une dégénérescence des neurones du SNC, perturbent la barrière hémato-méningée et la barrière entre le cerveau et le fluide cérébrospinal (Moxley et Francis, 1998), pénètrent dans le liquide cérébrospinal et provoquent les symptômes nerveux.

Une autre utilité de ce modèle animal était de tester l'efficacité des vaccins contre les infections expérimentales. Le modèle a mis en évidence une protection croisée contre Stx-I et Stx-II par des anticorps dirigés contre la sous-unité A. Ceci a permis de suggérer que la sous-unité A puisse être un candidat potentiel pour l'immunisation contre les manifestations systémiques de l'infection (Moxley et Francis, 1998).

2. 3. 9. 2. Les ruminants

Le bovin, le mouton, le daim, la chèvre et d'autres ruminants sont des réservoirs naturels de *E. coli* O157:H7 (Whipp *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 1998). Ces animaux ont été utilisés comme modèles pour l'infection, mais la susceptibilité à l'infection, le développement de la maladie et l'excrétion du micro-organisme variaient sensiblement selon l'âge de l'animal. L'infection expérimentale des bovins nouveau-nés, par exemple, a provoqué la diarrhée et des lésions d'AE au niveau de l'intestin grêle et du gros intestin de l'animal (Dean-Nystrom *et al.*, 1997). L'utilisation de jeunes bovins sevrés, de bovins adultes et de moutons a permis de déterminer la durée

des périodes d'excrétion de la bactérie, la sensibilité des méthodes de détection dans les fèces, et l'effet du changement de la diète sur l'excrétion (Whipp, 1994).

2. 3. 9. 3. Les porcs gnotobiotiques

Les porcs gnotobiotiques ont été couramment utilisés pour caractériser la pathogénie de *E. coli* O157:H7 et étudier le rôle des facteurs de virulence. L'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle essentiel du gène *eae* dans les lésions d'AE, et de détecter une virulence plus élevée chez les souches productrices de Stx-II que chez celles produisant la Stx-I. Les lésions rénales n'ont pas été observées suite à l'inoculation de la bactérie ou de ses toxines. Cependant, c'est le seul modèle animal dans lequel ont été développées des lésions du système nerveux central suite à l'administration orale de la bactérie (Moxley et Francis, 1998). L'incidence des lésions cérébrales est significativement plus élevée chez les animaux inoculés avec des isolats provenant de patients ayant développé un SHU, que chez ceux inoculés avec des isolats provenant de bovins porteurs sains. Les données générées par l'utilisation de ce modèle ont permis d'évaluer la virulence des isolats de *E. coli* O157:H7 chez l'homme (Moxley et Francis, 1998).

2. 4. Principaux épisodes de toxi-infections à *E. coli* O157:H7

Bien que la majorité des épisodes de toxi-infections à *E. coli* O157:H7 ait été associée à la consommation d'aliments d'origine bovine crus ou insuffisamment cuits, certains épisodes ont été liés à des aliments d'origine non bovine et même à des sources non alimentaires.

2. 4. 1. Le bœuf haché

E. coli O157:H7 a été isolée pour la première fois en 1982 dans les États du Michigan et de l'Oregon aux États-Unis d'Amérique, lorsque sont survenues deux épisodes de colite hémorragique, qui ont été épidémiologiquement reliées à la consommation de hamburgers insuffisamment cuits dans une chaîne de restauration rapide (Riley *et al.*, 1983). Les deux épisodes ont affecté au total 47 personnes, parmi lesquelles 33 ont été hospitalisées. Le boeuf haché était aussi le véhicule suspecté de l'infection dans les épisodes survenus en Ontario (clinique de santé) (1982), au Nebraska et en Alberta (1986) (Padhye et Doyle, 1992). Toutefois, un des plus importants épisodes est survenu au début des années 1993 dans les États de Washington, d'Idaho, de la Californie et du Nevada lorsque 731 cas ont été identifiés et quatre enfants sont morts. Quatre-vingt-dix pour cent des patients avaient consommé des hamburgers insuffisamment cuits dans des restaurants appartenant à une seule chaîne. La transmission a été amplifiée par dissémination secondaire de personne à personne (Bell *et al.*, 1994).

2. 4. 2. Les légumes

En novembre 1995, 21 personnes ayant lien avec le *Peel Memorial Hospital* (Ontario) ont présenté un portrait clinique conforme à la définition du cas suspect: diarrhée sanglante et crampes abdominales évoquant une colite hémorragique. Deux cas de transmission secondaire à des membres de la famille ont été aussi observés. Les résultats de l'enquête ont indiqué que la consommation d'une salade verte était la source de l'infection (Anonymous, 1997).

Un des épisodes majeurs, ayant affecté 7966 personnes dont trois sont décédées, est survenu à Sakai (Japon) en 1996. Le radis blanc servi dans les écoles était la source suspectée de l'infection, mais les résultats de l'enquête n'ont pu le confirmer (Michino *et al.*, 1998).

2. 4. 3. Les boissons et aliments acides

À l'automne 1991, 23 cas d'infections à *E. coli* O157:H7 ont été identifiés dans le sud-est du Massachusetts, causant l'hospitalisation de quatre personnes. L'organisme a été transmis par le cidre de pommes frais non-pasteurisé et ne contenant pas d'agents de conservation (Besser *et al.*, 1993; Miller et Kaspar, 1994). En octobre 1996, deux autres épisodes de gastro-entérite ont été signalés dans les États de la Côte Ouest Américaine et au Canada. Le premier, faisant 66 victimes et occasionnant un décès, a été reliée à la consommation de jus de pommes commercial non pasteurisé, et la deuxième au cidre (Anonymous, 1997). La mayonnaise, utilisée comme assaisonnement de salade, a aussi été incriminée dans un épisode affectant 50 personnes dans l'État de l'Oregon en 1993 (Miller et Kaspar, 1994). Ces épisodes ont reçu une attention particulière, puisque le cidre et la mayonnaise sont considérés à faible risque en raison de leur acidité (pH ~ 4).

2. 4. 4. L'eau

En 1991, une épidémie affectant 21 enfants a été associée aux activités dans un parc au bord d'un lac dans la région de Portland, Oregon. Le rapport de cas a indiqué que toutes les victimes se sont baignées dans le lac. L'eau de baignade contaminée par les matières fécales et ingérée par les enfants a été rapportée comme véhicule de

l'infection (Keene *et al.*, 1994). L'épidémie s'est étalée sur une période de 24 jours, ce qui a permis de conclure que l'organisme peut survivre dans l'eau des lacs et qu'il a une faible dose infectieuse.

En l'été 2000, des cas d'infections à *E. coli* O157:H7 affectant 2 000 victimes ont touché la ville de Walkertown en Ontario, Canada. L'eau municipale, contaminée par les fèces bovines, était le véhicule de l'infection. Les analyses environnementales ont permis de conclure qu'une série de mauvaises circonstances a eu lieu pour causer une épidémie d'une telle ampleur. Ce sont la pluie très abondante survenue aux mois d'avril et de mai, la présence de *E. coli* O157:H7 dans la zone environnante, l'exposition d'un des puits à une contamination par l'eau de surface et le système de traitement de l'eau surmonté par une forte turbidité. Il en a résulté une dissémination de l'infection parmi les habitants de la ville via le système de distribution de l'eau municipale (Anonymous, 2000).

2. 4. 5. Les viandes fermentées

Les viandes fermentées sont parmi les aliments les plus anciens de l'humanité et sont traditionnellement considérées sécuritaires vis-à-vis les agents pathogènes d'origine alimentaire. La préservation et la salubrité de ces viandes sont le résultat final de l'interaction de plusieurs facteurs, notamment le salage, la fermentation, le séchage et le fumage, dans un système balancé conçu pour préparer et livrer un produit attrayant et salubre. Le maintien subséquent à basse température avec la diminution du potentiel d'oxydo-réduction favorisent la croissance des bactéries fermentaires désirables au détriment des micro-organismes indésirables que l'on rencontre

habituellement dans les viandes triées (Epley *et al.*, 1992; ICMFS, 1980). Néanmoins, des épisodes de toxi-infections à *E. coli* O157:H7, ou à d'autres sérotypes du groupe EHEC, ont été associés aux viandes fermentées à plusieurs occasions. Le premier épisode documenté de toxi-infection par consommation de saucisson sec (salami) contaminé par *E. coli* O157:H7 est survenu en novembre 1994 dans les États américains de Washington et de la Californie. Parmi les 20 personnes atteintes, trois ont nécessité une hospitalisation et un enfant a souffert du SHU (CDC, 1995-a). Un épisode plus grave, impliquant une souche appartenant au sérotype O111:NM, a frappé l'Australie en 1995. Cet épisode s'est soldé par 150 personnes affectées, dont 23 ont développé le SHU suite auquel un enfant est mort (CDC, 1995-c; Robins-Browne *et al.*, 1998). Le produit impliqué était un saucisson fermenté demi-sec. Au Canada, un épisode impliquant un saucisson de Gènes (sec) a été rapporté en 1998 en Ontario. Trente-neuf personnes ont été touchées, dont 14 ont été hospitalisées incluant deux enfants ayant développé le SHU (Powell, 1999). Un autre épisode impliquant le salami a affecté 38 victimes en Colombie Britannique en 1999; le salami a été identifié comme véhicule de l'infection (MacDonald *et al.*, 1999).

Ces épisodes de toxi-infections ont semé le doute sur la capacité des procédés courants de fabrication de produits fermentés séchés à détruire *E. coli* O157:H7. Ils sont à l'origine des nouvelles lignes directrices émises par le FSIS (Nickelson *et al.*, 1996), et adoptées plus tard par l'ACIA (Santé Canada, 2000), au sujet de la validation de procédés en regard de la destruction de l'organisme.

2. 5. Les saucissons secs et semi-secs

Selon la définition de l'AMI (*American Meat Industry*), les saucissons secs sont “des produits carnés hachés ou moulus qui, sous l'action bactérienne, atteignent un pH de 5.3 ou moins et qui sont par la suite séchés pour retenir seulement 25 à 40 % de leur humidité et atteindre un ratio humidité/protéines pas plus élevé que 2.3 à 1.0” (Bacus, 1984). En général, ces produits ne sont pas fumés, sont fortement épicés, ont une texture très ferme et sont stables à 25°C. Les produits les plus connus sont le salami de Gènes, le salami sec et le pepperoni, tous originaires de l'Italie (Getty *et al.*, 2000). Les saucissons semi-secs, tels que les saucissons Mettwurst (allemands), les saucissons d'été (américains), et le cervelat, ont un taux d'humidité entre 45 à 50%, sont fumés, légèrement épicés, et habituellement chauffés jusqu'à une température interne entre 43 et 65°C (Getty *et al.*, 2000). Le pH, le degré de séchage (activité de l'eau ou a_w) et la température de conservation déterminent le degré de sécurité offert par les divers procédés de fabrication de produits fermentés séchés vis-à-vis des pathogènes alimentaires (Fig. 1).

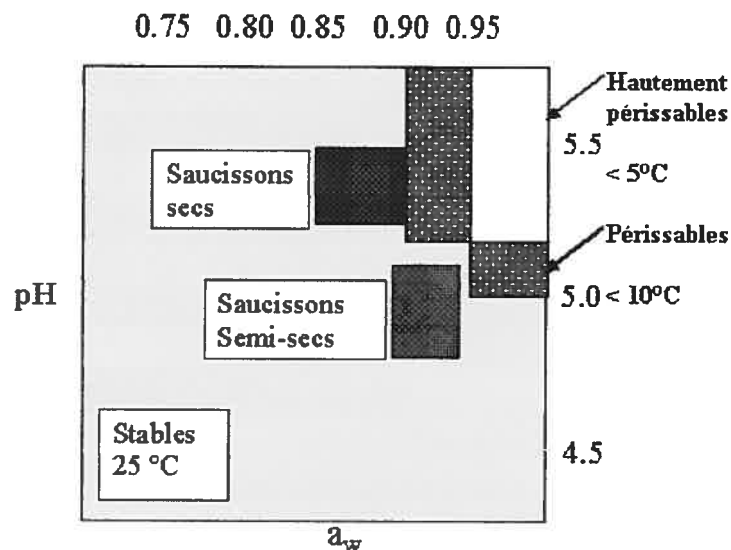


Fig. 1. Classification qui définit la stabilité microbologique des saucisses fermentées en fonction du pH et de l' a_w du produit ainsi que de la température d'entreposage.

2. 5. 1 Procédés de fabrication du saucisson sec

Le saucisson sec est formé à partir de la viande et du gras crus mélangés avec du sel, des épices et d'autres additifs, fermentés et séchés suffisamment dans des boyaux à des températures et des conditions d'hygrométrie appropriées. Le produit final sera en général conservé sans réfrigération et consommé sans être chauffé (Leistner, 1994). La fabrication du saucisson sec se déroule en trois étapes dont chacune, en plus de contribuer au développement de la flaveur et de la texture, participe à l'assurance d'un micro-environnement défavorable à la croissance des germes indésirables.

2. 5. 1. 1. La formulation

Cette étape comprend le hachage et le mixage des constituants de la mée. En général, les viandes grasses sont introduites en premier, puis la viande maigre et enfin

les autres ingrédients (sels, sucres, épices) et les ferments. La température d'opération doit se situer dans une fourchette de 8 à 10°C.

Le hachage est une étape critique qui doit être effectuée correctement afin d'obtenir une coupe franche des fibres musculaires. Ceci facilite la pénétration du sel et la solubilisation des protéines de la viande et permet d'éviter l'écrasement du gras qui entraînerait le farcissage. Le hachage s'accompagne toujours d'une élévation de la température des viandes, due au frottement de la viande contre les grilles du hachoir. Une étape de pré-découpage de la viande en petits morceaux réguliers précède le hachage dans certains cas (Leistner, 1994).

Le mixage ou pétrissage assure une répartition homogène de tous les constituants d'une mûlée, c'est à dire la viande maigre, le gras et les ingrédients tels que le sel, les sucres et les épices. Il permet aussi une bonne liaison de la pête par extraction des protéines. La durée optimale du pétrissage se situe généralement autour de trois minutes. Plusieurs fabricants pratiquent le pétrissage sous vide pour limiter le développement des germes aérobiques.

2. 5.1.1.1. Les ingrédients

Les saucissons fermentés sont en général formulés avec 2.0 à 3.5% de sel. Ceci assure la liaison de la pête et la flaveur désirée, ainsi que la préservation (Bacus, 1984). Pendant le pétrissage, le sel se dissout et s'ionise dans le jus de viande qui ressort à la surface. Les ions pénètrent dans les cellules musculaires qui, par osmose, libèrent une partie de leur eau, permettant ainsi la solubilisation des protéines et créant le gel de

surface. Ce gel assure à la pâte sa liaison et son collant. Les ions Na^+ non liés aux protéines exercent une action sur le goût.

L'action anti-microbienne du sel réside dans son pouvoir de fixer l'eau, nécessaire à l'activité et au développement des micro-organismes (Dabin et Jussiaux, 1994). Le sel soumet aussi les micro-organismes à une différence de pression osmotique résultant en une plasmolyse intense souvent irréversible (ICMSF, 1980). Les germes les plus sensibles sont *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas* spp. et les entérobactéries. Par contre, certains germes dits halophiles y sont résistants.

Le nitrate ou le nitrite (plus communément utilisé), autorisé à une dose de 0.3 à 0.4 g / Kg de pâte, favorise le développement de la couleur rouge caractéristique de la viande. Sous l'action des nitrates réductases produites par les ferments, le nitrate (NO_3) sera réduit en nitrite (NO_2) puis en oxyde nitrique (NO). Le NO se fixe sur la myoglobine pour former la nitrosometmyoglobine (de couleur brune), qui sera ensuite réduite en nitrosomyoglobine de couleur rouge stable. Le nitrite, renforcé par le sel, exerce une action bactéricide contre les *Clostridium* et les entérobactéries telles que les salmonelles et les coliformes (ICMSF, 1980).

Les sucres fermentescibles constituent l'élément nutritif essentiel au développement des micro-organismes responsables de la maturation du saucisson sec. Le dextrose (agent réducteur) et le saccharose (dont les produits d'hydrolyse sont réducteurs) sont les sucres les plus utilisés. Des doses minimales se situant autour de 0.5 à 0.6 % de la mûlée sont nécessaires pour atteindre un pH de 5.3 au cours de la maturation du

saucisson. L'excès de sucre non fermenté sert à atténuer la sensation des goûts acides ou piquants (Dabin et Jussiaux, 1994).

2. 5. 1. 1. 2. Les ferments de maturation

Le développement des ferments de maturation commercialisés a évolué à partir de l'isolement et de l'identification des micro-organismes de la flore normale responsables de l'effet désiré et, éventuellement, de leur addition à l'aliment au moment approprié du processus de fabrication. (Bacus, 1984). Ces ferments ont été sélectionnés en tenant compte de leur aptitude à se développer dans un milieu salé, nitraté, plutôt anaérobique et dans une fourchette de températures de 0 à 25 °C. Le but est de supplanter par colonisation et développement massifs les germes indésirables que l'on rencontre dans la viande et d'assurer une aromatisation et une acidification suffisante de même que la stabilité de la couleur (Dabin et Jussiaux, 1994). Les principaux ferments utilisés dans les saucissons secs sont:

- Les Micrococcaceae, genres *Micrococcus* ou *Staphylococcus* : Leur importance réside dans leur capacité de réduire le nitrate en nitrite par action du nitrate réductase (stabilisation de la couleur rouge caractéristique). Ils possèdent la catalase responsable de la destruction du peroxyde d'hydrogène, qui peut causer un verdissement et un rancissement du produit. Ils possèdent également des protéases et des lipases responsables respectivement de la décomposition des protéines et des lipides et, par conséquent, de l'aromatisation (Leistner, 1994).

- Les Lactobacillaceae, genres *Lactobacillus* ou *Pediococcus*, et les Streptococcaceae. Les bactéries utilisées sont homofermentaires (*L. carnis*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum* et *L. sake*), c'est-à-dire qu'elles fermentent le sucre en acide lactique (*lactic acid bacteria* ou LAB). L'acidification qui en résulte inhibe le développement de certains germes indésirables et permet la coagulation des protéines responsable de la prise en main (texture) du saucisson (Dabin et Jussiaux, 1994). Les *Lactobacillus* possèdent une pseudocatalase (décomposition des peroxydes) et sécrètent des lactocines, inhibiteurs de la flore parasite (Leistner, 1994). Certains *Pediococcus* sécrètent des pédiocines, bactéricides actifs contre *Clostridium botulinum*, *C. sporogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.

- Les levures : Certaines levures (*Debaryomyces hansenii*) contribuent à l'aromatisation par leur action protéolytique.

2. 5. 1. 2. Le poussage

La pâte est par la suite poussée dans un boyau, qui va conférer au produit final la texture et la taille désirées (Bacus, 1984). Le poussage peut aussi être effectué sous-vide, ce qui constitue un avantage indéniable pour la fabrication des saucissons secs. En effet, l'élimination des trous d'air réduit le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui permet le développement préférentiel des germes lactiques anaérobies et améliore la stabilité de la couleur (Leistner, 1994). La température des pâtes ne doit pas franchir le seuil minimal de -4 °C et maximal de 2 °C afin de permettre le bon déroulement du procédé (pâte pas trop dure). Ceci permet de réduire la fusion des lipides et le farcissage qui en résulte (Leistner, 1994).

2. 5. 1. 3. La fermentation et le séchage

Les saucissons frais, accrochés sur des bâtons disposés sur des cadres, seront fermentés puis séchés. Durant la fermentation, les saucissons seront portés à des températures de 20 à 35 °C dans des conditions d'hygrométrie variables (Bacus, 1984). Le but est de favoriser le développement de la flore lactique responsable des fermentations nécessaires pour la maturation du produit (Leistner, 1994), ainsi que d'assurer un début de séchage permettant de réduire la durée de sèche et d'éviter le développement excessif de la moisissure de surface due à un excès d'humidité (Dabin et Jussiaux, 1994).

Après la fermentation, durant laquelle le pH a diminué jusqu'à 4.8 à 4.9, le produit sera séché à 12 ou 14°C jusqu'à l'obtention des valeurs a_w permettant sa stabilisation et sa conservation sans recours au froid (inhibition des micro-organismes indésirables, dont la croissance et le métabolisme requièrent la disponibilité de l'eau). Cette étape permet aussi le déclenchement des processus de lipolyse et de protéolyse nécessaires au développement des arômes caractéristiques du saucisson (Leistner, 1994). Le processus de séchage doit être uniforme de façon que les portions interne et externe perdent leur humidité à la même vitesse. Il faut que l'eau éliminée à la surface du boyau soit en partie compensée par la migration de l'air de l'intérieur du produit vers l'extérieur (Bacus, 1984; Dabin et Jussiaux, 1994). Le degré de la disponibilité de l'eau est mesuré par l'activité de l'eau (a_w) qui est donnée par le ratio de la pression de la vapeur d'eau du produit (p) sur celle de l'eau pure (p') à la même température: $a_w = p / p'$.

2. 6. Ligne directrice des agences réglementaires

Les données épidémiologiques obtenues lors de l'épisode Washington-Californie de 1994 indiquent que le nombre de cellules vivantes de *E. coli* O157:H7 ingérées par les patients intoxiqués était faible (< 50) (Tilden *et al.*, 1996). Il a été alors décidé de viser une absence de cellules viables dans une portion de 100 g de produit (< 1 UFC/100g ou 0.01 UFC/g); ceci implique qu'un procédé sécuritaire devra faire décroître une population hypothétique initiale de *E. coli* O157:H7 de 10^3 UFC/g de cinq cycles logarithmiques en base de 10 (Reed, 1995; Getty *et al.*, 2000). Faute de pouvoir prévoir si à priori un procédé est sécuritaire ou non, les fabricants de saucissons secs et demi-secs doivent alors démontrer aux agences de réglementation américaine (FSIS) et canadienne (ACIA) que leur procédé détruit 5 log de *E. coli* O157:H7 en cours de fabrication (Nickelson *et al.*, 1996).

Étant donné que *E. coli* O157:H7 peut survivre aux procédés de fermentation séchage traditionnels (Glass *et al.*, 1992), une solution facile pour satisfaire aux exigences de la FSIS n'était pas évidente. Dans le but de fournir à l'industrie et aux agences de réglementation les informations scientifiques nécessaires pour valider les diverses méthodes d'inactivation de *E. coli* O157:H7 dans le saucisson sec et demi-sec, la *National Cattlemen's Beef Association* (NCBA) américaine a mis sur pied un comité d'étude, le *Blue Ribbon Task Force* (BRTF), qui a fait effectuer des essais de validation à l'Université du Wisconsin. Les paramètres considérés étaient le diamètre des saucisses (55 ou 105 mm), la température (21°C avec *Lactobacillus plantarum*; 32°C et 43°C avec *Pediococcus acidilactici*), l'intensité (pH 4.4 à 4.6 ou 5.0 à 5.3) de la fermentation, et le degré de séchage (13°C à 65% HR, jusqu'à H:P de 2.3, 1.9, ou

1.6). De plus, certains produits étaient gardés aux températures de fermentation pendant sept jours avant le démarrage du séchage et d'autres étaient chauffés (petit diamètre: 1 h à 38°C et 6 h à 52°C; gros diamètre: 1 h à 38°C, 1h à 43°C, 1 h à 49°C, et 7 h à 52°C; température du fumoir). Les résultats de cette étude ont permis de conclure que :1) en général, la fermentation et le séchage combinés ont amené des réductions de 2.0 à 2.5 log₁₀ UFC/g du pathogène; 2) le maintien pendant sept jours à une température de fermentation relativement élevée, avant de passer à l'étape de séchage, a considérablement augmenté l'efficacité des procédés vis-à-vis la destruction de *E. coli* O157:H7 et a généralement permis d'obtenir la réduction de 5D (1D correspond à une destruction de 90% de la population de l'agent pathogène) recherchée (32.2°C pour les petits diamètres; 43.3°C pour les petits et les gros diamètres); 3) une cuisson modérée des produits avant séchage a presque toujours suffi pour obtenir la réduction recherchée du pathogène; 4) les procédés à risque élevé sont ceux utilisant des produits bovins, un pH élevé, et un compte initial élevé de coliformes totaux (Nickelson *et al.*, 1996).

À la lumière de ces résultats, le FSIS a proposé cinq options aux fabricants en vue de résoudre les problèmes causés par la présence de *E. coli* O157:H7 dans les saucissons secs et demi-secs. Les options s'annonçaient comme suit :

1. Utiliser un traitement thermique pour atteindre les 5D de réduction (63°C, 4 min).
2. Appliquer un traitement validé induisant un niveau d'inactivation de 5D.

3. Soumettre le produit fini à un programme d'exposition et essais, qui impliquerait l'échantillonnage de 15 à 30 par lot.
4. Proposer d'autres approches induisant une inactivation de 5D.
5. Appliquer un système d'analyses des risques et de maîtrise des points critiques (*HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Point*) incluant une analyse de la mûlée crue et une inactivation de 2D.

Le comité BRTF a souligné le besoin urgent de recherches additionnelles sur l'influence des facteurs communs durant la fermentation et le séchage des saucissons secs et demi-secs sur la survie et l'élimination possible de *E. coli* O157:H7. Un protocole officiel de validation a été proposé dans lequel on requiert que la mûlée crue soit contaminée volontairement avec un mélange de cinq souches de *E. coli* O157:H7 ($> 2 \times 10^7$ UFC/g) en phase stationnaire de croissance. Le protocole requiert aussi que le mélange contienne des isolats provenant de la viande et de isolats d'origine humaine, y compris l'isolat du salami associé à l'épisode de 1994 (Nickelson *et al.*, 1996; Reed, 1995). L'inoculum doit être adapté à l'acidité par croissance initiale dans un bouillon de culture additionné de glucose (1%). La présence du pathogène doit être surveillée tout au long de la fabrication par étalement direct des dilutions appropriées (eau peptonée 0.1%) sur géloses de McConkey au sorbitol (Nickelson *et al.*, 1996; Reed, 1995).

2. 7. Études de validation de procédés de fermentation-séchage

Des études de validation de procédés vis-à-vis de la destruction de *E. coli* O157:H7 ont été réalisées en utilisant, entre autres, des tubes d'essais (Ellajosyula *et al.*, 1998),

des chambres à environnement contrôlé (Glass *et al.*, 1992) et des fumoirs (Hinkens *et al.*, 1996). Glass *et al.*, (1992) ont rapporté que la fermentation et le séchage réduisent au total de 1.16 log₁₀ UFC/g les populations de *E. coli* O157:H7 à partir d'un inoculum initial de 4.68 log₁₀ UFC/g de pâte de saucisse commerciale. Une réduction supplémentaire de 1 log₁₀ UFC/g a pu être obtenue suite à 2 mois d'entreposage à 4°C dans un emballage sous-vide. Des réductions < 2.0 log₁₀ UFC/g ont été obtenues lors d'études de validation de procédés de pepperoni fermentant à ≤ 36°C jusqu'à un pH entre 4.7 et 5.0 et séchant jusqu'à un ratio M:P ≤ 1.6 :1. Cependant, l'addition d'une phase de chauffage à 63°C (instantané) ou à 53 °C (60 min) en pré-séchage a permis d'atteindre 5 à 6 log₁₀ UFC/g de réduction (Hinkens *et al.*, 1996).

Les effets de différents régimes de conditionnement thermique de la pâte (congelée puis dégelée; tempérée à 13°C, congelée, puis dégelée; ou simplement réfrigérée), de la teneur en gras (15, 20 et 32%) et de conditions d'emballage (14 jours à -20, 4 ou 21°C) ont été aussi étudiés pour le salami et le pepperoni (Faith *et al.*, 1997, 1998-a et 1998-b). Quels que soient le conditionnement thermique et la teneur en gras de la pâte, les destructions de *E. coli* O157:H7 variaient entre 1.1 et 2.1 log₁₀ UFC/g. Pour le salami particulièrement, l'entreposage 14 jours à 21°C a entraîné 4 et 2 log UFC/g de réduction supplémentaire en présence d'oxygène ou sous-vide, respectivement (Faith *et al.*, 1998-a), tandis que 1 à 2 log₁₀ UFC/g de réductions supplémentaires ont été obtenus suite à l'entreposage à -20 ou à 4 °C, quelles que soient les conditions d'emballage. Dans le pepperoni à teneur en gras réduite (Faith *et al.*, 1998-b), des réductions supplémentaires de 4.53 à 5.56 log₁₀ UFC/g ont été observées après

entreposage à 21°C en présence d'oxygène ou sous-vide, tandis qu'une cuisson au four à 246°C durant 15 min était nécessaire pour assurer les 5 log de réduction dans les tranches congelées destinées à l'usage comme garniture de pizza, (Faith *et al.*, 1998-b).

Riordan *et al.*, (1998) ont étudié l'effet de la formulation en sel (2.5 à 4.8%) et nitrite de sodium (100 à 400 ppm) et du niveau du pH (4.4 à 5.6) sur la survie de *E. coli* O157:H7 dans le pepperoni. La combinaison de fortes concentrations en sel et nitrite de sodium avec un pH bas a généré 3.3 et 1.43 log₁₀ UFC/g de réduction par la fermentation et le séchage respectivement. Dans le cadre de la même étude (Riordan *et al.*, 2000), la croissance dans le bouillon d'infusion cerveau-cœur (brain heart infusion) additionné de 1% de glucose, appliqué afin d'augmenter la résistance des souches à l'acidité, a sensibilisé les cellules de *E. coli* aux processus thermiques appliqués avant ou après la fermentation. Les valeurs de D (55 à 60°C) étaient plus faibles pour les cellules adaptées (BHI + 1% de glucose) que pour celles non adaptées (BHI + 0.2% de glucose). De même, la fermentation jusqu'à un pH 4.5 (Comparé au pH standard de 4.8) a réduit les valeurs de D, lorsque les processus thermiques ont été appliqués après la fermentation.

La survie de *E. coli* O157:H7 et de *Salmonella* Typhimurium a été évaluée dans le saucisson semi-fermenté du type bologne (Getty *et al.*, 1999). La fermentation de la pâte a eu lieu dans des tubes d'essais, scellés et placés dans un bain-marie à température contrôlable par un microprocesseur. Des réductions > 7 log₁₀ UFC/g ont été obtenues dans les produits fermentés (pH 4.7 ou 5.2; 26.7°C) et chauffés pour 20

h, 10 h ou 3 h à 43.3°C, 41.6°C et 48.9°C, respectivement. Des réductions de plus de 5 log ont été obtenues dans le bologne traité dans un fumoir (Getty *et al.*, 1999), où le processus thermique comprenait 8 h à 26.7°C (température interne du produit), 24 h à 37.8°C, et 24 h à 43.3°C.

La fermentation à température croissante (29°C à 41°C; pH 4.6 et 5.0) a résulté en une réduction de 1.39 log₁₀ UFC/g de la population de *E. coli* O157:H7 dans les saucisses d'été (Calicioglu *et al.*, 1997). Un chauffage de 3.6 h à 54°C interne réduisait de > 7 log₁₀ UFC/g le nombre du pathogène dans les produits fermentés jusqu'à pH 4.6, mais un chauffage additionnel de 30 à 60 min était nécessaire pour aboutir au même niveau de réduction dans les produits fermentés jusqu'à pH 5.0.

La survie de *E. coli* O157:H7 a été étudiée dans des saucisses semi-secs du type soudjouk turque (Calicioglu *et al.*, 2001) en présence (pH 4.8) ou en absence (pH 5.5) d'un mélange commercial de ferments (ca. 8.0 log₁₀ UFC/g). Des réductions de 1.96 log₁₀ UFC/g ont été obtenues en présence de ferments, comparés à 0.28 log₁₀ UFC/g pour le produit fermenté naturellement. La présence de ferments commerciaux affectait aussi la sensibilité des souches aux traitements thermiques. Des réductions jusqu'à un niveau indétectable par étalement sur gélose (< 1.0 log UFC/g) ont été obtenues à partir d'un niveau initial de 5.69 log UFC/g après séchage. Pour les saucisses fermentées naturellement, les réductions variaient entre 0.45 à 4.47 log UFC/g, selon le temps de cuisson et la température d'entreposage.

De l'ensemble de ces études, il peut-être conclu que la fermentation et le séchage sont capables de réduire jusqu'à $2 \log_{10}$ UFC/g le nombre de *E. coli* O157:H7. Bien que le changement de pH, le contenu en sel et nitrite affectent la capacité de survie de la bactérie durant la fermentation et le séchage, des processus thermiques additionnels et l'entreposage sous différentes combinaisons d'emballage/temps et température étaient nécessaires pour obtenir le 5-log de réduction requis par les agences de réglementation

3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article 1

**A model study of *Escherichia coli* O157: H7 survival in fermented dry sausages -
Influence of inoculum preparation, inoculation procedure and selected process
parameters**

Fadia Naim¹, Serge Messier¹, Linda Saucier², Gabriel Piette²

GREMIP, Département de pathologie et microbiologie, faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6,
Canada ; ² Agriculture et Agroalimentaire Canada – Centre de Recherche et de
Développement sur les Aliments, 3600 boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe,
Québec, J2S 8E3 Canada

Journal of Food Protection, 66 (12): 2267-2275 (2003)

Abstract

The influence of inoculum preparation, inoculation level, and inoculation procedure on *Escherichia coli* O157:H7 inactivation during manufacture of fermented sausage was evaluated in a model study. Prior growth in glucose-enriched tryptone soya broth, which provided exposure to mildly acidic conditions (pH 4.8), had no effect on the later survival of *E. coli* O157:H7 strains 5-1 and ATCC 43894 in extremely acidic conditions (pH 2), but the same strains became sensitive to acidity after a 7 day incubation on the surface of refrigerated beef (as per the normal contamination route from slaughter to further processing). In subsequent sausage production trials, the extent of destruction observed for *E. coli* O157:H7 strains F-90, 5-1, and ATCC 43894, inoculated directly in the meat batter was unchanged when inoculation level was decreased from 7.3 to 4.7 log CFU/g, but the level of inactivation was ca. 1 log₁₀ higher when the surfaces of beef cuts, rather than in the batter, were inoculated 7 days prior to processing. Regardless of processing conditions (fermentation to pH ≤5.0 at 24°C or 37°C, drying at 14°C to a water activity [a_w] value of 0.91 or 0.79), strains F-90, 5-1, and ATCC 43894 showed a similar survival capacity during the manufacture of sausage. A ~2-log reduction in pathogen numbers was generally obtained after samples were dried to an a_w of 0.91, irrespective of fermentation temperature. The addition of a 5-day predrying holding stage at the fermentation temperature significantly (P < 0.05) increased the pathogen inactivation when fermentation was carried out at 37°C (but not when it was carried out at 24°C). However, significant pathogen reductions (4 to 5 log CFU/g) were achieved only for extensively dried products (a_w 0.79).

Introduction

Fermented sausages have traditionally been considered safe because of their low pH, their low water activity (a_w), and the inclusion of salt and sodium nitrite. However, outbreaks of toxigenic infections with *Escherichia coli* O157:H7 and related strains have been linked to dry fermented sausages on several occasions (Washington State, 1994 (7, 33); Australia, 1995, (8); Vancouver, Canada, 1999 (26)), raising concerns about the capacity of the manufacturing processes involved to inactivate *E. coli* O157:H7 and about the safety of the resulting products.

Following the 1994 outbreak, research studies were initiated to investigate the survival of *E. coli* O157:H7 in a variety of fermented meats in order to add safety measures to existing manufacturing processes, or to develop processes that would achieve a 5-log reductions in pathogen numbers, as required by the U.S. Department of Agriculture and Food Safety and Inspection Service (FSIS) (see review by Getty *et al.* (15)). Fermentation at low temperatures (23 to 24°C) was used to validate manufacturing processes for Turkish Soudjouk (5), salami (12), and a wide variety of German fermented sausages (32). Fermentation at intermediate temperatures (27 to 29°C) was used in studies on *E. coli* O157:H7 survival in Lebanon bologna (9, 11), Norwegian fermented dry sausage (24), and beef summer sausage (4), whereas fermentation at 36 to 38°C was used to investigate the pepperoni process (13, 14, 19, 29). Two more studies were concerned with the production of a safe fermented dry sausage (unspecified) and of Lebanon bologna and used fermentation temperatures ranging from 16 to 36°C (17) and from 27 to 43°C (16), respectively. The postfermentation pH ranged from 5.4 to 4.5 and, with the exception of beef summer

sausage (4), all products were subsequently dried at a temperature of 13 to 15°C (but 22°C was used for Turkish Soudjouk; (5), at relative humidities ranging from 65 to 85%. Drying was interrupted when a_w value reached 0.92 to 0.87, except in two studies in which European products were dried to an a_w value of ca. 0.80 (29, 32).

Even though the general effects of specific factors (e.g., fermentation temperature, final pH, extent of drying) on the extent of pathogen destruction could not always be clearly established as a result of differences in strain mixtures, product formulation, and process parameters, the following trends have been observed. (i) Fermentation alone always resulted in moderate inactivation of (0.1 to 1.5 log CFU/g), regardless of fermentation temperature or final pH (4, 12, 14, 19, 20, 24, 27, 29). More extensive killing (3.36 log CFU/g) was achieved only when salt and nitrite concentrations were raised to 3.3% and 300 ppm, respectively (29). (ii) Most of the pathogen inactivation was generally observed during the drying phase, although the total inactivation resulting from fermentation and drying generally remained in the range of 0.3 to 2.1 log CFU/g (5, 12, 14, 19, 24, 29), with a maximum inactivation level of 4.5 log CFU/g reported in Cervelat German sausage (32). (iii) An *E. coli* O157:H7 reduction of 5 log₁₀ CFU/g could always be achieved by heating the fermented batter to temperatures in the 46 to 63°C in the range of 0 to 60 min, with shorter heating times being required for more acidic sausages (4, 5, 9, 11, 16, 19, 30). (iv) The number of surviving pathogenic cells decreased with time during storage of the finished product, and the decrease was more pronounced at higher storage temperatures (e.g., 20°C) than at refrigeration temperatures (5, 10, 12, 14, 32). In addition, results obtained by Nickelson *et al.*, (23) suggested that a predrying holding phase at the fermentation

temperature may be helpful in achieving the target reduction of 5 log CFU/g for sausages after fermentation at $\geq 32^{\circ}\text{C}$ to a final $\text{pH} < 4.6$.

Most of the above-mentioned studies have been carried out strictly according to the procedure recommended by FSIS (28), and so far little attention has been paid to possible variations in the methods used to validate fermentation-drying processes with regard to the pathogen. Yet, since process validation studies generally involve the challenge of food with pathogens under controlled conditions, the same methodological considerations that were found to be important in pack inoculation studies (25), such as choice of the strain, culture maintenance, inoculum preparation, inoculum concentration, and inoculation procedure, are likely to be also relevant to process validation and therefore warrant investigation.

In particular, most past investigations on the fate of *E. coli* O157:H7 during fermentation-drying processes in the past have been carried out with the use of mixtures of 5 strains (4, 5, 9, 11-14, 16, 17, 19). This procedure is very useful in process validation studies because it is simple and greatly reduces the number of experiments required to estimate the potential of a given process to inactivate a variety of strains, isolated from fermented sausages (*E. coli* O157:H7 strains F-90 and 380-94), meat (*E. coli* O157:H7 strains EC505B, EC204P, C9490, 93-0133, ATCC 43895, and 011-82), infected patients (*E. coli* O157:H7 strains SLH 21788, Dec3A, Dec4b, Dec4E, ATCC 43889, ATCC 43894, and CL-8), or apple cider (*E. coli* O157:H7 strain C7927). Under these conditions, however, the respective extents of survival of the different strains cannot be evaluated, and the results obtained might

only reflect the resistance of the sturdiest strain. Also, the survival of any given strain may be influenced by the presence of the others. In addition, it is not possible to know whether the strains isolated from fermented sausages are more likely than the others to survive during the manufacture of sausage.

In view of the above considerations, and in order to address some of the questions left unanswered in the previous studies, a project was initiated to evaluate the influence of inoculum preparation, inoculation procedure, and inoculation level on the survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture of fermented sausages under various conditions of fermentation (temperature, final pH, presence or absence of predrying holding phase) and drying (to an a_w of 0.91 or 0.79) with the use of three strains inoculated into pure culture.

Materials and Methods

Organisms and cultures. *E. coli* O157:H7 strain F-90, isolated from dry-cured salami implicated in the Washington-California outbreak of 1994, was obtained from the Food Research Institute of the University of Wisconsin. Salami isolate 5-1, from the Vancouver outbreak of 1999, was provided by the Canadian Food Inspection Agency (Burnaby Laboratory, BC, Canada). Strain ATCC 43894 (previously CDC 932), a human isolate moderately resistant to acidity, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va.

Non-ATCC strains were provided as pure cultures on slant agar and kept at 4°C for a maximum of 48 h. Stock cultures were prepared by streaking individual colonies onto

MacConkey sorbitol agar (MSA; Oxoid, Ontario, Canada) and incubating them at 37°C for 24 h aerobically. Three presumed *E. coli* O157:H7 colonies (white, non-sorbitol fermenting) were plated as tight streaks on fresh MSA to produce confluent growth. After 24 h of incubation at 37°C, the cells were harvested with sterile swabs, suspended in tryptone soya broth (TSB; Oxoid) supplemented with glycerol (at final concentration of 10% [vol/vol]), and maintained at -80°C in 0.15 ml aliquots. The ATCC strain, provided as a freeze-dried culture, was first suspended in TSB and was then streaked on MSA plates and incubated aerobically for 24 h at 37°C, prior to preparing stock cultures.

Working cultures of acid-adapted cells were prepared by growing *E. coli* O157:H7 overnight at 37°C (with shaking at 150 rpm) in individual test tubes containing TSB supplemented with glucose (at a final concentration of 1% [wt/vol]) (TSBG), with two consecutive daily transfers. Working cultures of nonadapted cells were prepared in a similar manner with brain heart infusion broth (BHIB; Difco, Becton Dickinson, Ontario, Canada), which contains all of the nutrients normally found on the surface of meat. The cells were then harvested by centrifugation at $1\ 880 \times g$ for 20 min at 4°C, washed twice, and suspended in peptone water (at a final concentration of 0.1% [wt/vol]) (PW; Difco) before they were used in the experiments. Cell counts were determined by enumeration on duplicate MSA plates after appropriate dilutions in PW. These working cultures were subsequently used for acid tolerance assessment or for the inoculation of sausages.

Assessment of acid tolerance. Aliquots (0.1 ml) of *E. coli* O157:H7 cell suspensions (strains 5-1 and ATCC 43894) in PW, prepared from TSBG- or BHIB-grown cells, were added to individual flasks containing 100 ml of TSB acidified to pH 2 (with 12 N HCl) as previously described (1) to final concentrations of about 2×10^6 CFU/ml. The acidified suspensions were incubated aerobically at 37°C without agitation, and samples were withdrawn for the determination of viable counts immediately (after ca. 1 min) and then at 2-h intervals for up to 6 h. Alternatively, cultures were evenly distributed on the surfaces of beef meat slabs (ca. 47 cm²) at concentration of ca. 4×10^7 CFU/g. The slabs (ca. 6.8 by 6.8 by 2.1 cm with an average weight of 99 ± 10 g) were aseptically prepared in the laboratory the day before inoculation from whole trimmed beef chucks (shoulder clod) purchased locally. Under these conditions, the age of the meat is typically 7 to 10 days, and the surface pH was measured at 6.2 ± 0.2 . Preparation of the slabs was carried out under a laminar flow hood and was begun with the aseptic excision of the 5-mm external chuck surface, which was discarded, before the final slicing and cutting. The inoculated slabs were then placed in loosely closed sterile bags and held at 4°C for 1 week to simulate the average 7-day delay from slaughter to processing, and the adherent cells were detached from the meat surface by gently massaging the meat slabs by hand in the presence of 20 ml of PW. The detached cells (in 0.1 ml aliquots) were subsequently challenged in acidified TSB as described above. A noninoculated beef slab was also prepared under identical conditions and examined for the presence of *E. coli* O157:H7, after the 7-day incubation period. Acid tolerance was assessed on at least three separate occasions for duplicate samples.

Manufacture of dry sausages. Sausages were manufactured in a 65-m² biosafety level II pilot plant for meat processing (Faculty of Veterinary Medicine of Montreal University, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada). Coarse-ground (8-mm plate) pork boneless picnics, 90% lean beef shoulder cuts, and fresh pork back fat were purchased locally and kept at about 4°C until the batter was prepared. Beef cuts and back fat were ground through a 6 mm plate shortly before they were used in sausage formulation. The formulation of the batter was calculated with the Least Cost Formulator Blending System software (Least Cost Formulation Ltd, Virginia Beach, Va.).

Raw batters were prepared in 15-kg batches that always contained 25% beef, with the remaining portion consisting of pork trimmings, pork back fat, a commercial spice mixture (BSA Q11412, BSA Inc., Montreal, Canada), NaCl, and NaNO₂, to obtain a target composition of 20% fat, 4% NaCl, 120 ppm of NaNO₂, and 80 ppm of NaNO₃. Batter was prepared in a 45-kg capacity double-action paddle mixer (DMX100 model; Daniels Food Equipment, Parkers Prairie, Minn.), with a 3-min cycle (1 min each for ground raw meats, the spice mixture, and NaNO₂). A starter culture (Rosellac A, Rosell Institute Inc., Montreal, Quebec, Canada) composed of *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus varians*, and *Pediococcus* spp., hydrated in distilled water (15 g in 75 ml), was subsequently added, and mixing was resumed for an additional 1 min.

The batter was then stuffed into 30-mm-flat-diameter collagen casings (BSA Inc., Quebec, Canada) to form raw sausages at least twice as long as wide with the use of a

25-kg-capacity Ramon 25 electrical piston stuffer (Talleres Ramon, Villasar de Dalt, Spain). Temperature of the batter after stuffing was typically 10 to 11°C, and no smearing was observed. Fermentation was carried out at either $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 20-kg-capacity Arcos BI30 fermentation-drying unit; Arcos S.a.r.l., France) or $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (low temperature incubator model 307 C; Fisher Scientific Ltd, Ontario, Canada) at a relative humidity (RH) of 80 to 85% (minimum and maximum preset values) to obtain a target pH value of 5.0 (actual pH 4.9 ± 0.1), which typically took 48 h and 24 h at 24°C and 37°C , respectively. Alternatively, a 5-day predrying holding phase at fermentation temperature was added (the RH target values were not changed). Sausages were subsequently dried at $14.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in the drying compartment of the Arcos BI30 unit, which was adjusted to initiate and interrupt the drying phase every time RH values reached 80% and 70%, respectively. Drying for 7 to 9 days (regular drying) resulted in a_w values of 0.91 ± 0.02 and 0.84 ± 0.02 for sausages dried right after fermentation and for sausages dried after the 5-day holding phase, respectively, whereas extensive drying (for 18 to 20 days) resulted in a_w values of 0.79 ± 0.02 whether or not sausages had been held after fermentation.

Inoculation procedures. Raw batters were inoculated during formulation (during the first minute of mixing) with working cultures of *E. coli* O157:H7 cells (strains 5.1, F-90, and ATCC 43894) grown in TSBG at either $\geq 2 \times 10^7$ CFU/g or ca. 5×10^4 CFU/g. Alternatively, locally purchased whole beef chucks (shoulder clod), aseptically trimmed (5 mm of the outer surface) to minimize the number of indigenous microorganisms, were cut into ca. 1-kg pieces, and these pieces were surface inoculated with working cultures of *E. coli* O157:H7 (grown in BHIB or

TSBG) to a concentration sufficient to provide $\geq 2 \times 10^7$ CFU/g of batter prior to stuffing. The inoculated pieces were subsequently stored at 4°C for 7 days in loosely closed Whirl pack stomacher bags (VWR, Montreal, Quebec, Canada) to simulate conditions typically encountered by beef cuts between preparation and further processing. The cuts were then ground, and sausage manufacture proceeded as described above. Negative controls consisting of uninoculated sausages were also prepared.

Physico-chemical analyses. The moisture content of raw meat was determined with a CEM AVC80 microwave moisture analyzer (CEM Corporation, Matthews, N.C.). Fat and protein contents were measured instrumentally with TFE-2000 and FP-428 analyzers (Leco Corporation, St. Joseph, Mich.), respectively. The a_w value was determined with a chilled-mirror dewpoint type a_w -meter (Aqualab CX2, Decagon Devices, Pullman, Wash.). The pH of the culture medium was measured with an OAKTON pH/mv/°C meter (Cole Parmer Labcor Inc., Quebec, Canada), while the pHs of sausages and meat surfaces were measured with a Sentron pH meter (model 3001, Exeltec Inc., Quebec, Canada) equipped with Sentron ion-sensitive field effect transistor surface or penetration probes.

Microbiological analyses. The numbers of viable *E. coli* O157:H7 cells after acid challenge, in the raw sausage batter and in sausages collected at various stages of processing (after fermentation, after a 7-day holding time at the fermentation temperature, and after drying) were determined for duplicate samples by dilution and

surface plating. A 10 ml-aliquot of the pathogen suspension in acidified TSB (acid challenge tests), two 10-g portions of the batter, or two 10 g-composite samples of cross-sectional sausage slices were aseptically transferred to Whirl pack stomacher bags (VWR, Montreal, Canada) containing 90 ml PW and homogenized for 1 min in a reciprocal blender (400c stomacher; VWR) at maximum speed, and serial dilutions of the homogenates were spread on MSA plates (100:-1 aliquots) for enumeration of noninjured cells. The total counts of injured and uninjured cells were determined by spreading serial dilutions from the same homogenates on tryptone soya agar (TSA, Oxoid) plates and incubating them for 2 h at 37°C to allow the recovery of process-injured cells. The TSA-grown colonies were then replicated onto MSA by direct contact (2 min), and the MSA plates were incubated aerobically at 37°C for 24 ± 2 h. The identities of three presumptive *E. coli* O157:H7 colonies (white, non-sorbitol fermenting) were always subsequently confirmed by biotyping (API-20E, BioMerieux, Quebec, Canada) and serotyping (O157 agglutination test kit; Difco).

Statistical analyses. Analysis of variance was carried out with the GLM procedure of the SAS statistical package (SAS Institute Inc., Cary, N.C.), and significant differences between means were evaluated using Duncan's multiple-range test. The acid sensitivity results were analyzed by repeated-measures analysis of variance with the repeated statement of the SAS-GLM procedure.

Results

Assessment of Acid tolerance. Overnight growth in TSBG and BHIB resulted in final pHs of 4.8 ± 0.0 and 7.7 ± 0.5 , respectively, indicating that TSBG-grown cells had been exposed to moderately acidic conditions but not BHIB-grown cells. The pHs of the meat surfaces immediately after inoculation with *E. coli* O157:H7 and after 7 days incubation in the dark at 4°C were 6.2 ± 0.2 and 5.9 ± 0.0 respectively.

Irrespective of the strain, the sensitivity of the cells previously grown in TSBG (acid adapted) to acidic conditions was not statistically different ($P > 0.05$; Fig. 1) from that of cells grown in BHIB (unadapted cells), and cell inactivation after 6 h of exposure to the acidic medium (pH 2) was negligible (with decreases in cell counts ranging from 0.55 to 0.99 log CFU/ml and from 0.65 to 1.43 log CFU/ml for TSBG- and BHIB-grown cells, respectively). However, inactivation levels were considerably higher for the cells collected from meat surfaces whether these cells were initially grown in TSBG or BHIB, with surviving cell concentrations being reduced by > 5 log CFU/ml after 4 h of exposure (Fig. 1).

In all cases, no significant differences ($P > 0.05$) were found between the levels of viable cells recovered directly on MSA and the levels recorded after 2 h of resuscitation on TSA ($P > 0.05$), indicating that cell injury did not occur at a significant level.

Destruction of *E. coli* O157:H7 by the fermentation-drying process. Analyses of the noninoculated control sausages before fermentation, after fermentation and after

drying by direct plating on MSA revealed that none of them contained indigenous *E. coli* O157:H7 (data not shown), indicating that the raw meat used in the manufacturing process was free of the pathogen and that no cross-contamination had occurred during processing.

Because the inoculum concentration recommended by the FSIS in process validation studies is very high (2×10^7 CFU/g) compared with the expected pathogen level under real processing conditions, the destruction of *E. coli* O157:H7 after fermentation and drying was also measured for an initial contamination level of 5×10^4 CFU/g. Under the experimental conditions selected (fermentation at 24°C and drying to an $a_w < 0.9$), *E. coli* O157:H7 strain 5-1 and ATCC 43894 populations were reduced by 1.1 ± 0.5 log CFU/g and 1.4 ± 0.5 log CFU/g, respectively, when the inoculum concentration was ca. 5×10^4 CFU/g. Pathogen reduction levels were not significantly different ($p > 0.05$) when a higher inoculum level (2×10^7 CFU/g) was used, with reductions of 1.5 ± 0.5 and 1.4 ± 0.5 log CFU/g being achieved for strain 5-1 and ATCC 43894, respectively (Fig. 2). Therefore, a concentration of 2×10^7 CFU/g was used for all subsequent experiments.

Fermentation was faster at 37°C (ca. 24 h) than at 24°C (ca. 48 h), but the final pHs obtained were similar at both temperatures (4.9 ± 0.1), and no further decline in pH was obtained when the sausages were maintained at the fermentation temperature for an additional 5 days (holding time).

The results of the analysis of variance for the validation of the fermentation-drying process indicated that all the factors evaluated (bacterial strain, inoculation procedure, fermentation temperature, and process parameters) had significant effects ($P \leq 0.05$) on the inactivation of *E. coli* O157:H7 during processing (Table 1), and that these effects were highly interrelated (with many significant interactions being observed). However, the largest portion of the variance (see sum of the squares column) was related to the effects of process parameters, indicating that these parameters (extent of drying and addition of a predrying holding phase) had much greater effects on pathogen inactivation than the other factors did.

Detailed results on *E. coli* O157:H7 inactivation during validation of the sausage fermentation-drying process evaluated after plating on MSA, are shown in Table 2. When fermentation was carried out at 24°C, drying to an a_w of 0.91 yielded a level of pathogen destruction ranging from 1.95 ± 0.41 to 2.77 ± 0.27 log₁₀ CFU/g for sausages inoculated at the formulation stage. Inoculation of the pathogen onto the surfaces of beef cuts 7 days prior to processing resulted in a more extensive inactivation, with pathogen population reductions ranging from 2.94 ± 0.69 to 3.80 ± 0.30 log CFU/g. Extensive drying ($a_w = 0.79$) generally resulted in a larger decrease in pathogen numbers (3.38 to 5.24 log CFU/g), whereas the addition of a 5-day predrying holding phase at the fermentation temperature appeared to provide little benefit whether regular or extensive drying had been carried out (for a_w of 0.84 and 0.79, respectively).

The extent of inactivation achieved in sausages inoculated during formulation and then fermented at 37°C and dried to an a_w of 0.91 ranged from 1.55 ± 0.36 to 2.54 ± 0.59 log CFU/g, similar to the extent achieved after fermentation at 24°C. Inoculation onto the surfaces of beef cuts generally resulted in more extensive inactivation (2.15 ± 0.63 to > 3.94 log CFU/g). Additionally, pathogen destruction was more pronounced (3.88 ± 0.71 to 4.37 ± 1.58 log CFU/g) after drying to an a_w of 0.79. Contrary to what was observed at 24°C, a 5-day predrying holding phase at 37°C always resulted in a marked increase ($P \leq 0.05$) in pathogen inactivation after samples were dried for 7 to 9 days ($a_w = 0.84$). However, the effect of the holding phase on the inactivation of pathogens was not always seen when samples were dried to an a_w of 0.79 (19 to 20 days).

Overall, none of the strains tested were clearly more sensitive or more resistant to the fermentation-drying process under the experimental conditions used in this study. Also, the extents of inactivation measured after a recovery phase on TSA prior to plating and enumeration on MSA (3.53 ± 1.37 and 3.97 ± 1.31 log CFU/g for fermentations temperatures of 24 and 37°C, respectively; Table 2), were found to be similar to those measured without the recovery phase (3.92 ± 1.15 and 3.75 ± 1.35 log CFU/g for fermentation temperatures of 24 and 37°C, respectively; Table 2), suggesting that cell injury as a result of processing was considerably less extensive than cell death.

Discussion

The finding that the three isolates used in the present study were highly resistant to 6 h of exposure to a pH of 2.0 whether cells had been previously grown in moderately acidic conditions (TSBG) or not (BHIB) is consistent with the results of previous studies that have demonstrated an unusually high acid resistance for enterohemorrhagic *E. coli* (2, 18, 31) relying on three overlapping protection mechanisms (6, 21, 22). Protection of the BHIB-grown cells against extreme acidic conditions (this study) was likely afforded by the glucose-repressed, *rpoS*-dependent oxydative system, activated in the stationary phase (6, 21, 22). Even though the final pH after overnight growth in BHIB (7.7) was such that an inhibitor of the *rpoS*-dependent oxydative system was likely produced (6), this inhibitor was eliminated during the centrifugation-washing procedure used to prepare the cells for acid challenge or sausage inoculation (6). In TSBG-grown cells, the observed resistance to acidity was likely a result of the arginine- or glutamate-dependent decarboxylase systems, induced by the acidification (pH ~ 5.0) resulting from glucose fermentation (6, 21, 22). Since suitable sources of arginine and glutamate were present in the challenge medium (TSB) in the form of casein and soy peptone, decarboxylation and subsequent proton consumption were possible, enabling the maintenance of a viable internal pH during exposure to extreme external acidity. In any case, an inoculum previously grown in glucose-enriched TSB, as recommended by the FSIS, may be of little use in estimating the extent of *E. coli* O157:H7 inactivation during the manufacture of fermented sausages, since the cells will display strong resistance to acidity regardless of the presence of glucose in the growth medium.

Interestingly, all three strains inoculated onto the surface of refrigerated beef became acid sensitive after 7 days of growth. This acid sensitivity actually resulted in a more extensive pathogen inactivation (a reduction of ca. 1 log CFU/g) when processing was carried out under conditions commonly used by the industry in eastern Canada (fermentation at 24°C to pH 5.0 and drying to an a_w of 0.91). Therefore, the number of pathogenic cells inactivated by the process may actually be underestimated by the official validation procedure when inoculation is carried out at the formulation stage. Inoculation of the meat cuts prior to processing appears to be a better approach, particularly in studies aiming to modify a process to increase its safety, in which a realistic evaluation of pathogen destruction is needed. This information will be useful in the design of future experimental validation procedures, since process validation studies will likely be used more and more as a tool to ensure the production of safe food.

The official FSIS validation procedure recommends the inoculation of the raw sausage batter with pathogens at a level of 7 to 8 log CFU/g. This high concentration, justified by the need to enumerate the surviving pathogens after a reduction of the initial population by 5 log CFU/g, is unrealistic and might enable the pathogen to override some of the process-related stresses, resulting in the underestimation of pathogen inactivation during processing (25). This was not the case in the present study, however, since lowering the inoculum level to ca. 4.7 log CFU/g did not result in an increase in the inactivation of the pathogen. Different results were reported in the two other studies in which the effects of inoculum concentration on *E. coli* O157:H7 inactivation during processing have been investigated. In the first such

study (32), an increase of ca. 1 log CFU/g in pathogen inactivation during fermented sausage manufacture was observed when the inoculum concentration was lowered from 6 to 4 log CFU/g for both large diameter (90-mm) and small diameter (12-mm) products dried to a_w values of 0.94 and 0.81, respectively. In the second such study (24), the inoculation of the pathogen at a low concentration (3.7 log CFU/g) resulted in initial growth of the pathogen in the early fermentation phase, followed by sharp inactivation during subsequent fermentation and drying, resulting in an overall pathogen reduction level of 1.5 log CFU/g, compared to 1.7 log CFU/g for a higher inoculum concentration (7.1 log CFU/g). The discrepancies between the results of the three studies likely reflect differences in the strains, the sausage formulations (particularly spices), and the process parameters (temperature, time, pH, and a_w) selected. In any case, the difference in inactivation associated with high and low inoculum concentrations was always < 1 log CFU/g, suggesting that the unrealistically high pathogen concentration used in the FSIS validation procedure has no adverse effects on the results of validation with regard to pathogen inactivation.

In a comparative study involving seven strains, Buchanan and Edelson (3) found that the three strains associated with large enterohemorrhagic *E. coli* outbreaks displayed pH-independent acid tolerance in an in vitro challenge to extreme pHs (2.5 and 3), suggesting that these strains might be more likely to survive in fermented sausages than other strains are. If this was the case, the extent of the survival measured in validation studies in which sausages were inoculated with a mixture of strains would actually be that of the strain originally isolated in fermented sausage outbreaks, i.e., F-90 (4, 5, 12-14, 19) or USDA 380-94 (9, 11, 16). In the present study, all three

strains, inoculated separately into raw batter or onto raw meat destined for processing, displayed a similar degrees of sensitivity to the combinations of processing-related stresses to which they were subjected, suggesting that the survival of *E. coli* O157:H7 during manufacture of fermented dry sausages is common among many strains and not restricted to fermented sausage isolates. This finding is in agreement with the observation that the human isolate ATCC 43888 in pure culture and the mixture of strains isolated from animal products (EC505B, EC204P, and ATCC 43895) and humans (ATCC 43894 and CL8) survived the processes for the manufacture of Norwegian fermented dry sausage (24) and an unspecified fermented dry sausage (17), respectively.

The results of an earlier study (23) suggest that holding sausages at the fermentation temperature for an additional 4 to 7 days prior to the initiation of drying could increase the extent of *E. coli* O157:H7 inactivation during the manufacture of fermented sausages. However, whereas the positive effect of holding was clearly established for fermentation at 43°C, results obtained for products fermented at 21°C were inconclusive. The matter was no investigated, with subsequent research focusing on the use of heat treatments or storage under modified atmosphere to increase the extent of pathogen destruction to achieve the level of 5 log CFU/g targeted by the FSIS. The results of the present study demonstrate that the holding of sausages for 5 days at the fermentation temperature prior to drying does not result in an overall increase in pathogen inactivation when fermentation is carried out at 24°C. Predrying holding of the sausages after fermentation at 37°C always resulted in a marked increase in *E. coli* O157:H7 inactivation, but this step will not be a practical for most

sausage manufacturers, since the extent of destruction achieved reached the regulatory requirement of 5 log CFU/g only when sausages were subsequently dried to an a_w of 0.79, whereas the vast majority of commercial fermented-dried sausages are dried to an a_w of > 0.85 .

No clear conclusion about the effect of fermentation temperature on the extent of pathogen destruction during the manufacture of fermented sausages could be drawn from previously published experimental results. Tomicka *et al.* (34) developed a mathematical model that predicted more extensive inactivation of *E. coli* O157:H7 with the longer European-style fermentations carried out at 22°C than with the shorter American-style fermentations carried out at 37°C. However, these predictions, based on experiments carried out with a single unspecified strain, were not confirmed by the results of the present study, since the level of pathogen inactivation achieved after fermentation was carried out at 24°C for 48 h was not different from the level achieved when fermentation was carried out at 37°C for 24 h.

The levels of inactivation measured in this study following the inoculation of *E. coli* O157:H7 into sausage batter were similar to those previously reported, with a reduction of 2.17 ± 0.44 log CFU/g being observed when drying was interrupted at an a_w of 0.91. Of all of the combinations of processes tested, only extensive drying (to an a_w of 0.79) after fermentation and holding at 37°C may possibly result in the inactivation level of 5 log CFU/g extent of (actually $> 4.90 \pm 0.85$ log CFU/g) required by regulatory agencies. This combination of parameters may be useful for the very rare extremely dry manufactured products if the development of molds

during holding at elevated temperatures can be controlled (profuse growth was observed in this study). Overall, the results presented above and those of previous studies indicate that only mild heating of the fermented batter prior to drying and the storage of the finished product (packed to prevent further desiccation) at temperatures above 10 to 15°C are practical solutions for regular commercial products ($a_w \geq 0.85$) that are safer with respect to *E. coli* O157:H7, with the latter being the only solution currently available for many European-style products that cannot be heated without unacceptable quality deterioration.

Acknowledgments

We are grateful to Claude Leblanc and Michèle Lapointe for assistance with the sausage manufacturing experiments. This work was financially supported by the Conseil des Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec of the Government of Quebec.

References

1. Arnold, K.W., and C. W. Kaspar. 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 2037-2039.
2. Benjamin, M. M., and A. R. Datta. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1669-1672.

3. Buchanan, R. L., and S. G. Edelson. 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 4009-4013.
4. Calicioglu, M., N. G. Faith, D. R. Buege, and J. B. Luchansky. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature-cooked beef summer sausage. *J. Food Prot.* 60: 1158-1162.
5. Calicioglu, M., N. G. Faith, D. R. Buege, and J. B. Luchansky. 2001. Validation of a manufacturing process of fermented, semidry Turkish soudjouk to control *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 64: 1156-1161.
6. Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:3525-3535.
7. Centers for Disease Control. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44: 157-160.
8. Centers for Disease Control. 1995. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O11:NM-South Australia, 1995. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44: 550-551, 557-558.

9. Chikthimmah, N., R. C. Anantheswaran, R. F. Fobert, E. W. Mills, and S. J. Knabel. 2001. Influence of sodium chloride on growth of lactic acid bacteria and subsequent destruction of *Escherichia coli* O157:H7 during processing of Lebanon bologna. *J. Food Prot.* 64: 1145-1150.
10. Clavero, M. R. S., and L. R. Beuchat. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 2735-2740.
11. Ellajosyula, K. R., S. Doores, E. W. Mills, R. A. Wilson, R. C. Anantheswaran, and S. J. Knabel. 1998. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in Lebanon bologna by interaction of fermentation pH, heating temperature, and time. *J. Food Prot.* 61: 152-157.
12. Faith, N. G., N. Parniere, T. Larson, T. D. Lorang, C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1998. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in salami following conditioning of batter, fermentation and drying of sticks, and storage of slices. *J. Food Prot.* 61: 377-382.
13. Faith, N. G., N. Parniere, T. Larson, T. D. Lorang, and J. B. Luchansky. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and -20°C under air, vacuum and CO₂. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 47-54.

14. Faith, N. G., R. K. Wierzbica, A. M. Ihnot, A. M. Roering, T. D. Lorang, C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in full- and reduced-fat pepperoni after manufacture of sticks, storage of slices at 4°C or 21°C under air and vacuum, and baking of slices of frozen pizza at 135, 191 and 246°C. *J. Food Prot.* 61: 383-389.
15. Getty, K. J. K., R. K. Phebus, J. L. Marsden, D. Y. C. Fung, and C. L. Kastner. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiol.* 8: 141-170.
16. Getty, K. J. K., R. K. Phebus, J. L. Marsden, J. R. Schwenke, and C. L. Kastner. 1999. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in large (115 mm) and intermediate (90 mm) diameter Lebanon-style bologna. *J. Food Sci.* 64:1100-1107.
17. Glass, K. A., G. M. Loeffelholz, J. P. Ford, and M. P. Doyle. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Env. Microbiol.* 58:2513-2516.
18. Gorden, J., and P. L. C. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61:364-367.
19. Hinkens, J. C., N. G. Faith, T. D. Lorang, P. Bailey, D. Buege, C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1996. Validation of pepperoni process for control of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 59: 1260-1266.

20. Kofoth, C., W. R. del, and M. Gareis. 1998. Beeinflussung des Überlebens von enterohemorrhagischen *E.coli* (EHEC) in Rohwurstprodukten. *Mitteilunhsblatt der BAFB*. 140:153-159.
21. Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J.L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:4097-4104.
22. Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3094-3100.
23. Nickelson, R. II, C. W. Kaspar, E. A. Johnson, and J. B. Luchansky. 1996. Update on dry fermented sausage and *Escherichia coli* O157:H7 validation research. University of Wisconsin_Madison. Research report no. 11-316. National Cattlemen's Beef association, Chicago, IL.
24. Nissen, H., and A. Holk. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiol.* 15: 273-279.
25. Notermans, A., P. in't Veld, T. Wijtzes, and G. C. Mead. 1993. A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiol.* 10:145-157.

26. Powell, D. A. 16 November 1999. Fleetwood Sausage Company extends investigation of confirmed contamination *E. coli* scare prompts salami recall. Available at: fsnet-1@listserv.uoguelph.ca. Accessed 17 January 2000.
27. Pozzi, W., L. Beutin, and H. Weber. 1996. überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst. *Fleischwirtschaft*. 76:1300-1311.
28. Reed, C. A. 1995. Challenge study - *Escherichia coli* O157:H7 in fermented sausage. Letter to Plant managers; April 28, 1995. USDA, FSIS, Washington, D. C.
29. Riordan, D. C. R., G. Duffy, J. J. Sheridan, B. S. E. Eblen, R. C. Whiting, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented meat. *J. Food Prot.* 61:146-151.
30. Riordan, D. C. R., G. Duffy, J. J. Sheridan, R. C. Whiting, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 2000. Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 1726-1729.
31. Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, and J. L. Slonczewski. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* 176:1729-1737.

32. Stiebing, A., J. Baumgart, and N. Vogt. 1998. EHEC - Überlebensfähigkeit in schnittfester und streichfähiger Rohwurst. *Mitteilungsblatt der BAFF*. 140:160-167.
33. Tilden, J. Jr., W. Young, A. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S.B. Werner, J. Hollingsworth, and J. G. Morris. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health*. 86:1142-1145.
34. Tomicka, A., J. Chen, S. Barbut, and M. W. Griffiths. 1997. Survival of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 in a model system representing fermented sausage production. *J. Food Prot.* 60:1487-1492.

Table 1. Analysis of variance pertaining to the inactivation of *E. coli* O157:H7 during sausage production trials^a.

Source	df	Sum of squares	Mean squares	F _{cal}	P (F > F _{cal})
Model	35	416.92	11.91	22.03	< 0.0001
Strain	2	37.81	18.91	34.96	< 0.0001
Inoculation (mode of)	1	15.95	15.95	29.50	< 0.0001
Temperature (fermentation)	1	16.29	16.29	30.13	< 0.0001
Process (parameters)	2	281.33	140.66	260.13	< 0.0001
Strain × temperature	2	4.18	2.09	3.86	0.0222
Inoculation × temperature	1	8.29	8.29	15.34	0.0001
Strain × process	4	5.28	1.32	2.44	0.0473
Inoculation × process	2	12.75	6.38	11.79	< 0.0001
Temperature × process	2	12.99	6.49	12.01	< 0.0001
Strain × inoculation × temperature	2	6.39	3.20	5.91	0.0031
Strain × temperature × process	4	5.78	1.44	2.67	0.0326
Error	269	154.46	0.54		
Corrected total	304	562.38			

¹ Only the significant effects and combinations are shown

Table 2. Combined effects of inoculation procedure and process parameters on reduction of *E. coli* O157:H7 population from initial level during production of fermented-dried sausages^a.

	Fermentation at 24°C		Fermentation at 37°C	
	Inoculation in batter	Surface inoculation	Inoculation in batter	Surface inoculation
A. Enumeration on SMAAC				
Strain F-90				
Fermentation/drying to a _w 0.91	2.77 ± 0.27 b B x	3.80 ± 0.30 a A x	2.54 ± 0.59 b C x	> 3.94 a x
Fermentation/drying to a _w 0.79	> 3.65 A x	> 3.90 ^b A	3.88 ± 0.71 a AB x	> 4.10 a
Fermentation/holding/drying to a _w 0.84	1.34 ± 0.04 b C y	2.75 ± 0.12 a B y	3.80 ± 0.00 b B x	> 4.26 x
Fermentation/holding/drying to a _w 0.79	> 3.75 a	3.80 ± 0.19 a A y	> 3.92 A	> 4.10 x
Strain 5-1				
Fermentation/drying to a _w 0.91	2.00 ± 0.47 a C x	2.94 ± 0.69 a B x	1.55 ± 0.36 a C y	2.15 ± 0.63 a C y
Fermentation/drying to a _w 0.79	3.38 ± 0.20 b B x	4.13 ± 0.41 a A x	4.31 ± 1.52 a B x	3.68 ± 0.79 a B x
Fermentation/holding/drying to a _w 0.84	1.64 ± 0.13 b C y	2.37 ± 0.09 a B y	4.34 ± 0.24 b B x	> 5.13 a A x
Fermentation/holding/drying to a _w 0.79	4.20 ± 0.90 a A y	4.46 ± 0.54 a A x	> 5.42 a A x	4.05 ± 0.95 b B x
ATCC 43894				
Fermentation/drying to a _w 0.91	1.95 ± 0.41 b C x	3.76 ± 1.66 a B x	2.21 ± 0.21 a C x	3.37 ± 1.95 a B x
Fermentation/drying to a _w 0.79	5.24 ± 0.22 a A x	4.37 ± 1.35 a AB x	4.14 ± 0.93 a B y	4.37 ± 1.58 a AB x
Fermentation/holding/drying to a _w 0.84	3.11 ± 0.44 a B y	3.65 ± 0.63 a B y	4.31 ± 0.24 b B x	> 5.56 a x
Fermentation/holding/drying to a _w 0.79	> 5.39 a A	5.42 ± 0.52 a A x	> 5.36 A	> 5.36 A x

B. Enumeration on TSA/SMAC

F-90

Fermentation/drying to a_w 0.91	1.93 ± 0.32 b B _y	3.61 ± 1.70 a C _x	3.02 ± 0.28 a C _x	3.43 ± 0.53 a C _x
Fermentation/drying to a_w 0.79	4.59 ± 0.25 b A _x	> 5.13 a A _x	4.23 ± 0.42 a B _x	4.63 ± 0.61 a B _y
Fermentation/holding/drying to a_w 0.84	2.30 ± 0.07 b B _y	4.68 ± 0.24 a B _y	4.98 ± 0.46 b a B _x	> 5.74 a _x
Fermentation/holding/drying to a_w 0.79	4.58 ± 1.02 a A _y	4.63 ± 0.45 a A B _y	> 5.49 A _x	> 5.20 A _x

5-1

Fermentation/drying to a_w 0.91	1.52 ± 0.77 a C _x	2.51 ± 1.11 a B _x	1.92 ± 0.29 a C _x	2.34 ± 0.90 a D _x
Fermentation/drying to a_w 0.79	2.75 ± 0.25 b B _y	3.82 ± 1.14 a A _x	3.74 ± 0.99 a B _x	3.85 ± 0.89 a C _x
Fermentation/holding/drying to a_w 0.84	2.06 ± 0.04 b B C _y	2.56 ± 0.14 a B _y	4.73 ± 0.16 b B _x	> 5.7 a A _x
Fermentation/holding/drying to a_w 0.79	2.94 ± 0.25 b A _y	4.09 ± 0.33 a A _y	> 5.62 a A _x	4.87 ± 0.54 b B _x

ATCC 43894

Fermentation/drying to a_w 0.91	1.24 ± 0.21 b D _y	2.90 ± 1.37 a B _x	2.12 ± 0.23 a C _x	2.84 ± 1.10 a C _x
Fermentation/drying to a_w 0.79	3.89 ± 0.40 a B _x	3.80 ± 1.19 a A B _x	3.78 ± 0.87 a B _x	4.41 ± 0.87 a B _x
Fermentation/holding/drying to a_w 0.84	2.32 ± 0.20 b C _y	3.36 ± 0.26 a B _y	4.48 ± 0.23 b B _x	> 5.32 a _x
Fermentation/holding/drying to a_w 0.79	4.71 ± 0.83 a A _x	4.29 ± 0.52 a A _y	> 5.37 A _x	> 5.27 A _x

^a Values shown are average reductions from the initial concentrations in raw batter ± standard deviations (n ≥ 6). Data represent two independent experiments, and two separate samples were assessed in duplicate at each sampling time (n = 8). Means with the same lower case letter (a, b, c) in the same row for the same fermentation temperature are not significantly different (P > 0.05).

Means with the same capital letter (A, B, C) in the same column and for the same enumeration medium are not significantly different ($P > 0.05$). Means with the same lowercase italic letter (*x*, *y*) in the same row for the same inoculation mode and strain are not significantly different ($P > 0.05$).

^b No colony was detected by direct plating (the minimal detection limit was 2 log CFU/g).

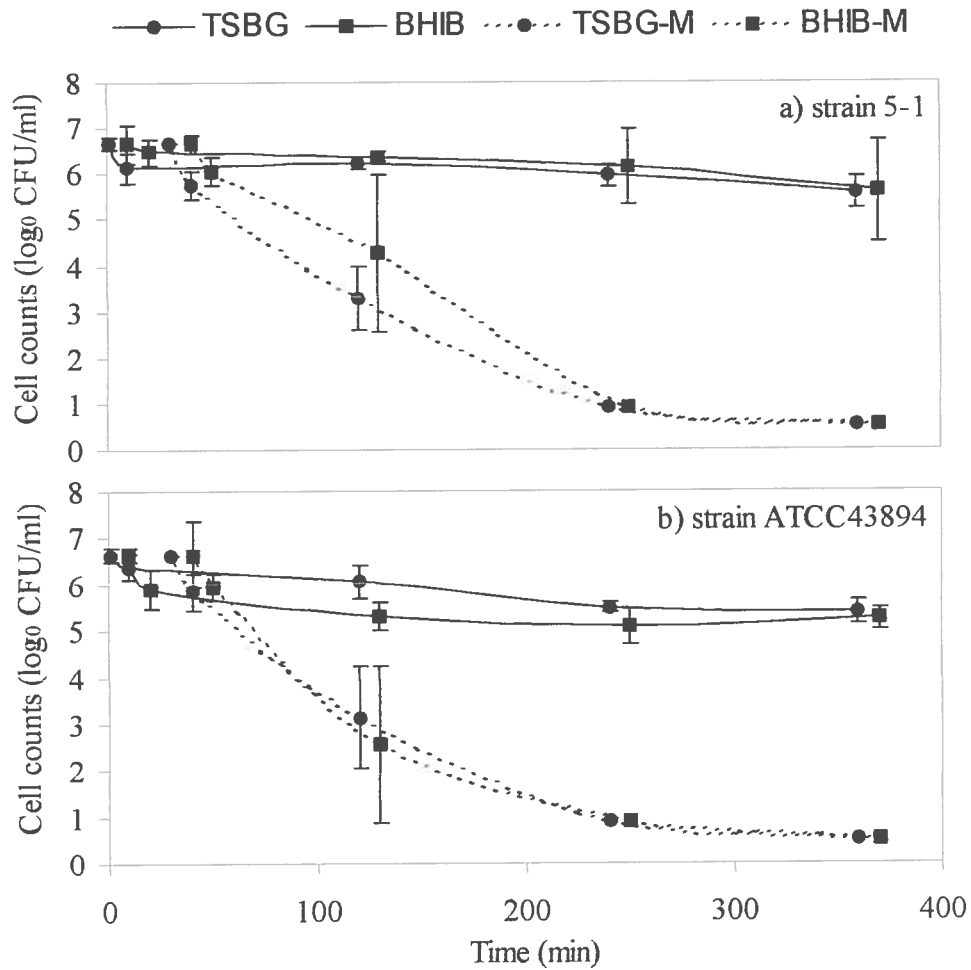


Fig. 1. Survival of *E. coli* O157:H7 cells during a 6-h exposure to TSB acidified to pH 2.0 with concentrated HCl. Values reported are the average of at least two independent experiments carried out in duplicate. Bars represent standard deviations. The cells had been grown in glucose-enriched TSB (●) or in BHIB (■), then immediately immersed in acidified TSB (full line) or further incubated for 7 days at 4°C at the surface of beef cuts (dotted line) prior to being tested for acid sensitivity.

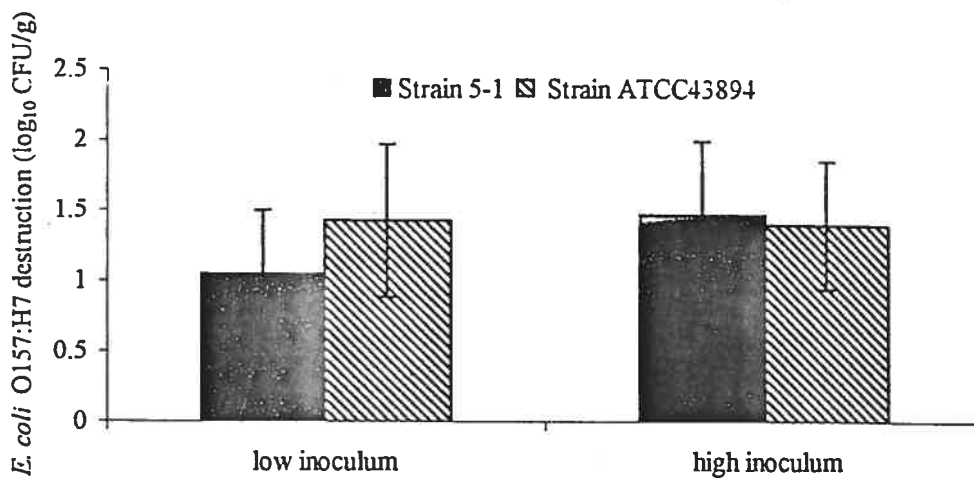


Fig. 2. Mean destruction of *E. coli* O157:H7 in fermented dry sausages, initially inoculated during formulation with low (ca. 5×10^4 CFU/g) and high (ca. 2×10^7 CFU/g) pathogen concentrations. Bars represent standard deviations.

3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article 2

***Escherichia coli* O157:H7 in fermented-dry sausages: post processing *in vitro*
digestion challenge**

Fadia Naim¹, Serge Messier¹, Linda Saucier², Gabriel Piette²

GREMIP, Département de pathologie et microbiologie, faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6,
Canada ; ² AAC – Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments, 3600
boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8E3 Canada

Soumis pour publication dans *Applied and Environmental Microbiology*

Abstract

Fermented dry sausages, inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 during batter preparation, were submitted to an in vitro digestion challenge to evaluate the extent to which passage through the human gastrointestinal tract could inactivate the pathogenic cells, previously stressed by the manufacturing process. The numbers of surviving *E. coli* O157:H7 cells remained constant after a 1 min exposure of the finely chopped sausage to synthetic saliva or during the following 120 min exposure to synthetic gastric juice at an initial pH of 2.0. However, significant growth ($P \leq 0.05$) of the pathogen (1.03 to 2.16 log₁₀ CFU/g) was observed in a subsequent 250 min exposure to a synthetic pancreatic juice at pH 8.0. In a different set of experiments, fractions from the gastric suspension were transferred into the synthetic pancreatic juice at 30-min intervals to mimic the dynamics of gastric emptying. Concurrently, the pH of the remaining gastric fluid was reduced to 3.0, 2.5 and 2.0 respectively, to simulate the gradual reacidification of the stomach contents after the initial buffering effect resulting from meal ingestion. Under these new conditions, pathogen growth during pancreatic challenge was observed in the first few fractions released from the stomach (90 min exposure, pH 2.5), but growth was no longer possible in the fractions submitted to the most severe gastric challenge (120 min of exposure, pH < 2.2).

Introduction

Escherichia coli O157:H7 is recognized as a foodborne pathogen of major significance. The organism colonizes the large intestine and produces one or more potent cytotoxins referred to as Shiga-like toxins (Stx). These toxins are responsible for severe hemorrhagic colitis in humans with, in some cases, life-threatening complications such as hemolytic uremic syndrome or thrombotic thrombocytopenic purpura (22, 35). Outbreaks of food poisoning attributed to *E. coli* O157:H7 have traditionally been traced back to foods of bovine origin, in particular improperly cooked ground-beef and raw milk. However, several recent outbreaks have involved high-acid foods, previously considered as safe, such as fermented dry sausages (10), mayonnaise (42), and apple cider (7, 43).

The ability of *E. coli* O157:H7 to withstand the acidic conditions encountered in various foods has been noted by several investigators (7, 20, 21, 32, 34, 43). In addition, the results of studies in which media-grown cells were introduced into synthetic gastric juice, or in liquid media acidified to pH values comparable to those of the normal fasting stomach (pH 2), have generally suggested that passage through the stomach would be insufficient to inactivate the pathogen. This fact is consistent with the data from epidemiological investigations which indicated that as few as 10 to 100 cells of *E. coli* O157:H7 per g of raw ground beef were sufficient to cause illness (1, 3, 9, 22).

In reality, the situation is considerably more complex for several reasons. Firstly, the organism always enters the digestive system within a food matrix. Waterman and

Small (41) postulated that high protein content in food (such as in ground beef, boiled egg white) may protect enteric bacteria against the killing effect of gastric acids. Using Fisher rats to model the effect of food on the gastric killing of bacteria, Drouault *et al.* (16) obtained a 7% survival in the stomach when a 10^9 CFU/ml suspension of *Lactobacillus lactis* was fed to the animal, compared to 100% survival when the organism was mixed with the rat food. Likewise, Charteris and co-workers (11) reported that milk proteins and porcine gastric mucin increased the gastric and small intestinal transit of some *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species, during an *in vitro* upper intestinal transit tolerance study.

Secondly, dry-sausage borne *E. coli* O157:H7 cells have undergone acidic and osmotic stresses during the fermentation and drying phases of sausage manufacture, respectively. According to the hurdle theory (26), these stresses may later affect the ability of the pathogen to cope with the additional stresses encountered during human digestion, such as the extreme acidity in the stomach and the action of bile extracts (intestine) and of the enzymes lysozyme (saliva), pepsin (stomach) and pancreatin (intestine).

In light of the above, and with the ultimate goal of providing new data to refine risk analysis with respect to *E. coli* O157:H7 in fermented-dry sausages, a study was undertaken to further evaluate the fate of sausage borne *E. coli* O157:H7 cells during human digestion under realistic conditions, i.e., using cells that had undergone the process-related stresses, ingested as an integral part of infected sausages, and exposed

to a salivary, gastric, and pancreatic challenge under conditions that reflected the actual transit through the human digestive system.

Materials and Methods

Organisms and cultures. *E. coli* O157:H7 strain F-90, isolated from dry-cured salami implicated in the Washington/California outbreak of 1994, was obtained from the Food Research Institute of the University of Wisconsin. The *E. coli* O157:H7 strain 5-1, salami isolate from the Vancouver outbreak of 1999, was provided by the Canadian Food Inspection Agency (Burnaby Laboratory, BC, Canada). The strain ATCC 43894 (previously known as CDC 932), an O157:H7 human isolate moderately resistant to acidity, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassasw, Va.).

The non-ATCC strains were provided as pure cultures on slant agar and kept at 4°C for a maximum of 48 h. Stock cultures were prepared by streaking individual colonies onto MacConkey sorbitol agar (MSA; Oxoid, Ontario, Canada), and incubating at 37°C for 24 h aerobically. Three presumptive *E. coli* O157:H7 colonies (white, non-sorbitol fermenting) were plated as tight streaks on fresh MSA to form confluent cell monolayers. After 24-h incubation at 37°C, the cell layers were harvested using sterile swabs, and then suspended in tryptone soya broth (TSB; Oxoid) supplemented with glycerol (10% vol/vol, final concentration), and maintained at -80°C in 0.15-ml aliquots. Strain ATCC 43894, provided as freeze-dried cultures, was first suspended

in TSB then streaked on MSA plates and incubated aerobically for 24 h at 37°C, prior to preparing the stock cultures.

Working cultures were prepared from the second consecutive daily transfer of *E. coli* O157:H7 cells growing overnight at 37°C (with shaking at 150 rpm) in individual test tubes containing TSB supplemented with glucose (1% wt/vol final concentration; TSBG). The cells were then harvested by centrifugation at $1\ 880 \times g$ for 20 min at 4°C, washed twice and suspended in peptone water (PW; Difco, Beckton Dickinson, Ontario, Canada; 0.1%) before experiments. Cell counts were evaluated by enumeration on duplicate MSA plates, after appropriate dilutions in PW.

Simulated environments. Synthetic saliva was prepared as follows (39): 100 ml each of 25 mM K_2HPO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 1570 mM $KHCO_3$, 100 mM NaCl, and 1.5 mM $MgCl_2$ were mixed together. To this were added 6 ml of 25 mM citric acid and 100 ml of 15 mM $CaCl_2$. The pH was adjusted to 6.7 with 5N NaOH or concentrated HCl (12 N) and the volume made up to 1 liter. The medium was sterilized by autoclaving, and when it reached ambient temperature, α -amylase (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Ontario, Canada) from human saliva and lysozyme (Sigma-Aldrich) from chicken egg white were added at 1g/liter and 0.1g/liter respectively (final concentrations) (13).

The synthetic gastric juice was prepared as described by Molly *et al.* (33) to contain (g/liter, final concentrations): glucose, 0.4; yeast extract, 3.0; bacto peptone, 1.0;

porcine mucin, 4.0; cysteine, 0.5; NaCl, 0.08; NaHCO₃, 0.4; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; CaCl₂·2H₂O, 0.008; MgSO₄·7H₂O, 0.008; xylan, 1.0; and soluble starch, 3.0; to which 2.0 USP/l of pectin and 1 ml/l of Tween 80 were added. The preparation was adjusted to pH 2.0 with concentrated HCl (12 N) prior to sterilizing by autoclaving, and the pH was corrected following sterilization and equilibration to room temperature, when required (with 12 N HCl or 5.0 N NaOH). Finally, pepsin (P-7000; Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 3 g/liter (11).

Manufacture and inoculation of sausages. Sausages were manufactured in a 65-m² biosafety level II pilot plant for meat processing (Faculty of Veterinary Medicine of Montreal University, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada). Coarse ground (6 mm plate) pork boneless picnics, 90% lean beef shoulder cuts, and pork back fat fresh were purchased locally and kept at about 4°C until batter preparation. Beef cuts and back fat were ground through a 6 mm plate shortly before use in sausage formulation. Formulation of batter was calculated using the Least Cost Formulator Blending System software (Least Cost Formulation Ltd, Virginia Beach, Va.).

Raw batters were prepared in 2-kg batches which always contained 25% beef; with the remaining portion consisting of pork trimmings, pork back fat, and commercial spice and cure mixtures (BSA Q11412, BSA Inc., Montreal, Canada), NaCl, NaNO₂ and NaNO₃ to obtain a target composition of 20% fat, 4% NaCl, 120 ppm of NaNO₂, and 80 ppm of NaNO₃. The ground meat mix was inoculated with pure cultures of the *E. coli* O157:H7 strains F-90, 5-1 or ATCC 43894, at final concentrations of ca. 2 X

10^7 CFU/g (24). The batters were prepared in a 5-pound capacity stand mixer (K5SSWH model; KitchenAid, Greenville, Ohio), with a 4-min cycle (1 min each for ground raw meats, *E. coli* inoculum, the spice mixture, and NaNO_2). A starter culture (Rosellac A, Rosell Institute, Montreal, Quebec, Canada), composed of *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus varians*, and *Pediococcus* spp. hydrated in distilled water (15g in 75 ml), was also added, and mixing continued for one additional minute. Negative controls consisting of uninoculated sausages were also prepared similarly.

The batter was then stuffed into 30 mm flat diameter collagen casings (BSA Inc.) to form raw sausages at least twice as long as wide. Fermentation was carried out at $24 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (Arcos B130 fermentation-drying unit; Arcos S.a.r.l., France; 20 kg capacity), at a relative humidity (RH) of 80 to 85% (minimum-maximum preset values), to reach a target pH value of 5.0 (actual value 4.9 ± 0.1), which typically took 48 h. Subsequent drying proceeded at $14.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in the drying compartment of the Arcos B130 unit adjusted to initiate and interrupt the drying phase every time RH values reached 80% and 70%, respectively, to achieve a water activity value (a_w) of 0.90.

Physico-chemical analysis. The moisture content of raw meat was determined in a CEM AVC80 microwave moisture analyzer (CEM Corporation, Matthews, NC). Fat and protein contents were measured instrumentally, by use of TFE-200 and FP-428 analyzers (Leco Corporation, MI, USA), respectively. The a_w was determined with a chilled-mirror dewpoint type a_w -meter (Aqualab CX2, Decagon Devices, Pullam,

WA). The pH of digestive fluids was measured with an OAKTON pH/mv/°C meter (Cole Parmer Labcor Inc., Quebec, Canada), while the pH of sausages was measured using a Sentron pH meter (model 3001; Exeltec Inc., Quebec, Canada), equipped with Sentron ion-sensitive field effect transistor surface or penetration probes.

Microbiological analyses of the sausages. Sausages (two sausages per sampling point), including non-inoculated controls, were tested for viable *E. coli* O157:H7 by direct plating prior to stuffing, after fermentation, and after drying. At each sampling time, two 10-g portions of the batter or two 10-g composite of cross-sectional sausage slices were aseptically transferred to Whirl pack stomacher bags (VWR, Montreal, Canada) containing 90 ml PW, homogenized for one min in a reciprocal blender (400c stomacher, VWR) at maximum speed, and serial dilutions of the homogenate were spread on MSA plates (100- µl aliquotes) for enumeration of noninjured cells. The total counts, corresponding to process-injured and uninjured cells, were done using the modified overlay procedure (30). Briefly, aliquotes (0.1 ml) from adequate dilutions were spread on tryptone soya agar plates (TSA, Oxoid), which were incubated for 2h at 37°C. TSA agar was then lifted up with a sterile spatula, and used to overlay corresponding sterile MSA plates. After a 2-min contact allowing the colonies replication, the TSA was removed by simple knock down, and MSA replica were incubated aerobically at 37°C for 24 ± 2 h. White colonies were enumerated, and *E. coli* O157:H7 was confirmed by biotyping (API-20E; BioMerieux, Quebec, Canada) and serotyping (O157 agglutination test kit; Difco).

***In vitro* digestion tests.** Digestion tests were carried out in a closed system (37) in which the substrate (food matrix) was in contact with the enzymes, with no removal of the digestion products. Optimal pHs and temperature were used for each enzyme, or mixture of enzymes, and reactions were stopped by raising or decreasing the pH (20). Briefly, samples of dry sausage, previously inoculated during the formulation step with the strains F-90, 5-1, or ATCC43894, were chopped into small pieces. To simulate mastication, which affords a mechanical breakdown of the food and adequate surface area for subsequent enzyme activity, thirty-g portions were aseptically transferred to Whirl pack stomacher bags (VWR), diluted with 30 ml of artificial saliva, and homogenized for 1 min with the stomacher. In order to mimic the transient passage into the gastric environment, 240 ml of artificial gastric juice pre-adjusted to pH 2 (pH of fasting stomach) was added.

Gastric challenge was carried out in either one of two modes. In the first one (static digestion experiments), the *E. coli* cells were challenged at 37°C in the gastric juice for 2 h, with periodic (every 15 min) mixing of the bag contents by hand massaging for about 10 sec. The PH was not adjusted to compensate for the buffering effect of the sausage so that conditions to which *E. coli* cells were exposed were close to those encountered in the first fraction leaving the stomach, prior to reacidification of the stomach contents. This corresponded to the minimum gastric challenge to which the sausage would be exposed. In the second mode (dynamic digestion experiments), a more complex model was used in which 50 ml portions of the suspension in gastric phase were taken off the stomacher bag every 30 min (for a maximum digestion process of 2 h) and further exposed to pancreatic challenge, thus simulating the

gastric emptying (based on an exponential emptying rate of the gastric content beginning about 30 min after starting to eat a solid meal (25, 31). Concurrently, the pH of the remaining gastric fluid was adjusted to 3.0, 2.5 and 2.0 at 30 min, 60 min, and 90 min (HCl 12N) in an attempt to mimic the hydrochloric acid secretion (31). The enumeration of *E. coli* O157:H7 was carried out in duplicate (on MSA and TSA for uninjured and injured cells, respectively, as described above) in the saliva, upon immersion in the gastric juice, at 60-min intervals or before and after each pH adjustment (occurring every 30 min) for the static and dynamic digestion experiments, respectively, and at the end of the gastric phases.

The pancreatic challenge was carried out in a synthetic pancreatic juice as follows; the pH of the emptied gastric contents was raised to 8.0 with 5N NaOH, and pancreatin (P-1500) and porcine bile extract (B8631) (Sigma-Aldrich) were added at 0.1% and 0.3%, respectively. The pancreatic suspension was incubated aerobically at 37°C for 4 h with periodic homogenization and *E. coli* O157:H7 cells counts were carried out immediately (ca., 1 min) after the addition of pancreatin and bile salts, and at 1- or 2-h intervals for the static and dynamic digestion, respectively. Negative controls, consisting of 30-g sausage samples homogenized in 270 ml PW and incubated for 6 h at 37°C, were also prepared.

Statistical analyses. Triplicate and duplicate experiments of in vitro digestion, under static or dynamic conditions, respectively, were conducted for inoculated sausage samples originating from 4 independent productions. Analysis of variance was carried

out with the GLM procedure of the SAS statistical package (SAS Institute Inc., Cary, N.C.), using the Duncan's multiple-range test to discriminate means.

Results

Sausage fermentation and drying resulted in a $1.53 \pm 0.50 \log_{10}$ CFU/g reduction in *E. coli* O157:H7 numbers from the initial concentration (ca. $2 \times 10^7 \log_{10}$ CFU/g) in the raw batter, and the numbers of cells which survived the process remained constant during subsequent refrigerated storage of the sausage for the whole experimental period (maximum of 3 weeks at 4°C). Therefore the concentrations of the pathogen initially exposed to digestion challenge ranged from 5.11 ± 0.59 to $5.17 \pm 0.79 \log_{10}$ CFU/g.

Regardless of the strain used, the 1 min exposure of the contaminated sausage to saliva did not result in a decrease in *E. coli* O157:H7 counts ($p > 0.05$), compared to the negative controls in peptone water (data not shown).

Results of the static digestion experiment are shown in Fig. 1. Mixing the sausage portion massaged in the synthetic saliva with the synthetic gastric juice (pH 2.0) resulted in an initial pH of 3.2 ± 0.1 , which increased to 4.0 ± 0.2 during the 2-h gastric challenge. No inactivation of *E. coli* O157:H7 was observed in that period of time, regardless of the strain ($p > 0.05$). Significant growth ($p \leq 0.05$) occurred in the pancreatic juice, so that the pathogen levels at the end of the intestinal challenge were

2.69 and 2.21 \log_{10} CFU/g higher than at the beginning of the gastric challenge, for the strains 5-1 and ATCC 43894, respectively.

Results of the dynamic digestion experiments are presented in Fig. 2 and 3. During the early phases of the gastric challenge (Fig. 2), the pH was lowered in steps from 3.6 to 3.0 (30 min), 2.5 (60 min), and 2.0 (90 min). Limited growth of *E. coli* O157:H7 was observed for strains 5-1 and ATCC 43894 (Fig. 2), with the numbers of viable cells increasing by 0.63 and 0.69 \log_{10} CFU /g, respectively ($p < 0.05$), in the first 90 min of exposure to gastric juice. A similar trend was observed for strain F-90, even though statistical analysis failed to confirm growth as a result of wider distributions of values around the means. Growth was no longer observed in the last phase of the gastric challenge (90 to 120 min), in which the pH was further reduced to values < 2.2 , and the number of viable cells either remained stable (strains ATCC 43894, F-90) or decreased (strain 5-1).

The survival and/or growth pattern in the pancreatic juice depended on the severity of the previous gastric challenge (Fig 3). Growth was generally not observed in the first 120 min of pancreatic challenge ($p > 0.05$), and the population of *E. coli* O157:H7 remained stable. During the next 120 min in pancreatic juice, the cells that had been submitted to the milder gastric challenge (30 min, final pH of 3.56) actively grew ($p < 0.05$), so that their final concentrations after the 240 min exposure to the pancreatic juice was considerably higher than their initial concentrations (by 1.44, 2.04, and 2.05 \log_{10} CFU/g for strains ATCC 43894, F-90, and 5-1, respectively). The capacity of

the cells to grow in the pancreatic juice generally decreased with the increasing severity of the gastric challenge they had been exposed to, and growth was generally not observed with cells that had undergone the most severe gastric challenge (120 min, final pH 2.2).

Sublethal injury was not observed during the static gastric challenge or during the pancreatic challenge, since colony counts on MSA plates were not statistically different ($p > 0.05$), whether a prior revival phase on TSA plates had been used or not. Significant damage ($p < 0.05$), however, was observed as a result of the gastric challenge under dynamic conditions.

Discussion

The fact that no reduction in *E. coli* O157:H7 numbers was seen as a result of exposure of the ground contaminated sausage to synthetic saliva (this study) is not surprising at first. It is well known that the outer membrane that shields the murein layer of Gram-negative bacteria protects them from hydrolysis by lysozyme (18, 23, 29, 36). On the other hand, a recent report by Alakomi *et al.* (2) indicated that lactic acid (5-10 mM) could disrupt the outer membrane of Gram-negative bacteria, including *E. coli* O157:H7, making it more susceptible to hydrolysis by lysozyme (10 $\mu\text{g/ml}$, 4 min). The concentration of lactic acid in sausages as a result of fermentation was not measured in our study, but it is known to be typically 45 mM in commercial fermented sausages. At these concentrations, we would expect the *E. coli* O157:H7 cells to be sensitized to the action of lysozyme. However, the contact time (1 min)

with saliva and the concentration (0.1 µg/ml) of lysozyme have likely been insufficient to yield a noticeable inactivation of the pathogen.

Food is known to exert a buffering effect on the gastric content during human digestion, protecting enteric pathogens against the acidity of the gastric juice (41). The effect is dual and results from the interaction between the existing basic food moieties and the acids released in the stomach (31, 40), as well as to the hydrolysis of proteins by pepsin, with concurrent release of amines. This buffering effect was evidenced in the present study when gastric challenge was carried out under static conditions, with no pH adjustment, and resulted in a moderate decrease of acidity. As a result, *E. coli* O157:H7 cells are normally expected to be exposed to pH values between 3 and 4 in the early phases of gastric digestion, when ingested in a dry-sausage matrix, values at which the organism has been found to survive for several days in mayonnaise (42) and for at least 24 h in acidified TSB (32).

The buffering effect of food observed in early gastric challenge, which causes the postprandial rise reported in the scientific literature (31, 37), is later gradually overwhelmed by the progressive release of additional acid in the stomach, so that the gastric pH reaches its basal value of 2.0 about 2 h after the meal intake (31). In the meantime, gradual emptying of the stomach contents takes place, starting at about 30 min after ingestion, so that the *E. coli* O157:H7 cells contained in the contaminated dry sausages will be exposed to acidic challenges of various intensity, depending on the length of time they remain in the stomach before being pushed towards the intestine.

The fact that most of *E. coli* O157:H7 cells can survive the most severe gastric challenge (this study, dynamic digestion experiments) is consistent with the results of various studies in which the resistance of the organism was evaluated in various synthetic media (5, 6, 32). Survival was likely ensured by the glutamate-dependent decarboxylase system, induced by the acidification (pH ~ 5.0) resulting from glucose fermentation (8, 14, 17, 27, 28), since the cultures initially used to inoculate the sausage batter were prepared from overnight TSBG-grown *E. coli* O157:H7 cells. Because suitable sources of glutamate were present in the challenge medium as a result of meat hydrolysis by proteolytic enzymes, decarboxylation and subsequent proton consumption, required for maintaining a viable internal pH during exposure to extreme external acidity, were possible.

Survival of *E. coli* O157:H7 in the pancreatic juice (this study) was not surprising, since optimal pH conditions prevailed in this environment. Also, it is well known that the LPS layer of the outer membrane of Gram-negative bacteria acts as a barrier for many detrimental external agents, resulting in an inherent resistance to the detergent action of bile salts and to degradation by digestive enzymes (e.i., pepsin, trypsin and others contained in the pancreatin preparation (2). Extrinsic factors, such as acquisition of a mucin surface coating (11) and entrapment in hydrophobic lipid moieties, such as reported for *Salmonella* Typhimurium in cheddar cheese (15), may also afford additional physical barrier, shielding the microorganism from proteases. In the present study, the capacity of *E. coli* O157:H7 to further grow during the pancreatic challenge was strongly related to the duration and intensity of the previous gastric challenge. The cells that reached the intestinal compartment after a gastric

exposure no longer than 90 min (minimum pH 2.5) were able to grow in the pancreatic juice. A lag phase (typically ca. 120 min) was, however, generally observed, during which the sublethal damages resulting from the manufacturing process and the gastric challenge were repaired. In contrast, the cells that had undergone the most severe gastric challenge (120 min, minimum pH 2.0) could no longer grow in the pancreatic juice, even though they remain viable and could later be revived on a rich medium, such as TSA.

The gastric and pancreatic juices have long been perceived as pH and enzymatic barriers to the survival of ingested microorganisms during the human digestive process (38). However, these juices offer no real challenge to *E. coli* O157:H7 cells ingested within contaminated dry sausages (this study). The knowledge that a large portion of these cells are transferred to the pancreatic compartment with sublethal damages that will be later repaired in the intestine to resume active growth comes in support to the previous finding that a few cells (10 to 100 cells/g) of ingested *E. coli* O157:H7 were sufficient to cause illness (1, 3, 4, 12, 28). From a food safety point of view, this implies that the industrial processes used to manufacture dry sausages must be designed in such a way that no viable *E. coli* O157:H7 cell can ever be found in an average portion of sausage for human consumption, because no additional protection will be afforded by the subsequent digestive process. This new information will be very valuable in refining our assessment of the risk associated with the manufacture of fermented dry sausages with regard to *E. coli* O157:H7.

Aknowledgments

We are grateful to Dr. Edward Farnworth and Isabelle Mainville for advice on the set up of the in vitro digestion experiments. This work was made possible through a grant from the Conseil des Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec of the Government of Quebec.

References

1. Abdul-Raouf, U. M., L. R. Beuchat, and M. S. Ammar. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef as affected by pH, acidulant, and temperature. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 2364-2368.
2. Alakomi, H. L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva, and L. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative Bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 2001-2005.
3. Anonymous. 1993. Report on the *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in the western states. Food Safety and Inspection Serviv, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
4. Archer, D. L. 1996. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 91-95.

5. Arnold, K. W., and C. W. Kaspar. 1995. Starvation and stationary-phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 2037-2039.
6. Benjamin, M. M., and A. R. Datta. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 1669-1672.
7. Besser, R. E., S. M., Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.* 269: 2217-2221.
8. Castanie-Cornet, M-P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and W. Foster. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 3525-3235.
9. Centers for Disease Control. 1993. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 42: 258-263.
10. Centers for Disease Control. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44: 157-160.

11. Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrotestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.
12. Choi, S. H., D. J. Baumber, and C. W. Kaspar. 2000. Contribution of *dps* acid stress tolerance and oxydative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 3911-3916.
13. Cornelius, C., C. Lentren and A. Wink eds. 1981. Geigy Scientific Tables. Units of measurement. Body fluids, composition of the body. Nutrition, Volume 1. ISBN, USA.
14. Cui, S., J. Meng, and A. A. Bhagwat. 2001. Availability of glutamate and arginine during acid challenge determines cell density-dependent survival phenotype of *Escherichia coli* strains. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 4914-4918.
15. D'Aoust, J. Y. 1985. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. *Am. J. Epidemiol.* 122: 717-719.
16. Drouault, S., G. Corthier, S. D. Ehrlich, and P. Renault. 1999. Survival, physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 4881-4886.

17. Foster, J. W. 2000. Microbial responses to acid stress, p. 99-115. *In* G. Storz (ed.), bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.
18. Garcia-Graells, C., B. Masschalck, and C. W. Michiels. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Prot.* 62: 1248-1254.
19. Gauthier, S. F., C. Vachon, and L. Savoie. 1986. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *J. Food Sci.* 51: 960-964.
20. Glass, K. A., J. M. Loeffelholz, J. P. Ford, and M. P. Doyle. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH, or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 2513-2516.
21. Gorden, J., and P. L. C. Small. 1992. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61: 364-367.
22. 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: 60-97.
23. Hauben, K. E. Wuytack, C. Soontjens, and C. W. Michiels. 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J. Food Prot.* 59: 350-355.

24. Hinkens, J. C., N. G. Faith, T. D. Lorang, P. Bailey, D. Buege, C. W. Kaspar, and J. B. Luchanski. 1996. Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 59: 1260-1266.
25. Hunt, B. J. N., and W. R. Spurrell. 1951. The pattern of emptying the human stomach. *J. Physiol.* 113: 157-168.
26. Leistner, L. 1994. Stable and safe fermented sausages world-wide, p. 160-175. *In* G. Campbell-Platt and P. E. Cook (ed.), *Fermented Meats*. Blackie Academic and Professional, New York.
27. Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonezewski, and J. W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4097-4104.
28. Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Maik, G. N. Bennett, and J. W. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 3094-3100.
29. Masschalck, B., D. Deckers, and C. Michiels. 2002. Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of Gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 65: 1916-1923.

30. McCleery, D. R., and M. T. Rowe. 1995. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. *Letters in Appl. Microbiol.* 21: 252-256.
31. McLauchlan, G., G. M. Fullarton, G. P. Crean, and K. E. McColl. 1989. Comparison of gastric body and antral pH: a 24-hour ambulatory study in healthy volunteers. *Gut.* 30: 573-578.
32. Miller, L. G., and C. W. Kaspar. 1994. *Escherichia coli* O157:H7. Acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57: 460-464.
33. Molly, K., M. V. Woestyne, I. De Smet, and W. Verstraete. 1994. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganisms-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 7: 191-200.
34. Naim, F., S. Messier, L. Saucier, and G. Piette. 2003. A model study of *Escherichia coli* O157: H7 survival in fermented dry sausages - Influence of inoculum preparation, inoculation procedure and selected process parameters. *J. Food Prot.* 66 (12): 2267-2275.
35. O'Brien, A. D., and J. B. Kaper. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today, and tomorrow. p. 1-11. *In* Kaper, J. B., and A. D. O'Brien (ed),

Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.

36. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington D. C.
37. Savoie, L. 1993. Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of *in vitro* models. Can J. Physiol. Pharmacol. 72:407-414.
38. 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.
39. Söderholm, K. J. M. R. Mukherjee, and J. Longmate. 1996. Filter leachability of composites stored in distilled water or artificial saliva. J. Dental Res. 75: 1692-1699.
40. van Herwaarden, M. A., A. Samson, and A. J. P. M Smout. 1999. 24-h recording of intragastric pH: technical aspects and clinical relevance. Scand. J. Gastroenterol. 34 Suppl. 230: 9-16.
41. Waterman, S. R., and P. L. C. Small. 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extreme acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. Appl. Env. Microbiol. 64: 3882-3886.

42. Zhao, T., and M. P. Doyle. 1994. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.* 57: 2526-2530.
43. Zhao, T., M. P. Doyle, and R. E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with or without preservatives. *App. Env. Microbiol.* 59: 2526-2530.

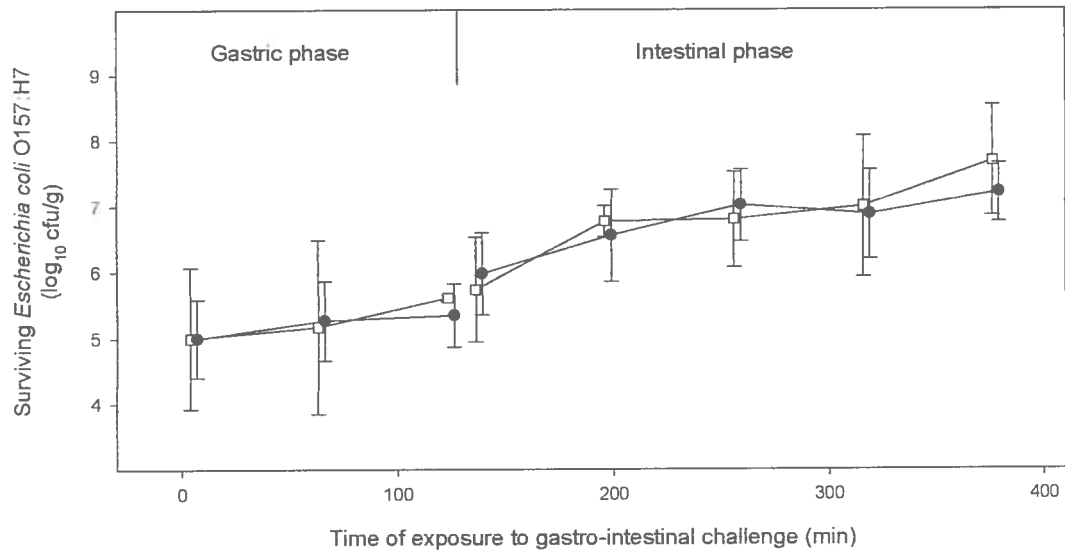


Fig. 1. Survival and/or growth of *E. coli* O157:H7 cells experimentally inoculated in dry sausage during an *in vitro* digestion challenge under static conditions. Values reported are the average of at least two independent experiments carried out in duplicate. Bars represent standard deviations. Open squares and filled circles are for strains 5-1 and ATCC 43894, respectively. Data represent total counts for injured and uninjured cells measured on MSA after resuscitation on TSA plates. For the same strain, means bearing identical letters are not significantly different ($p > 0.05$).

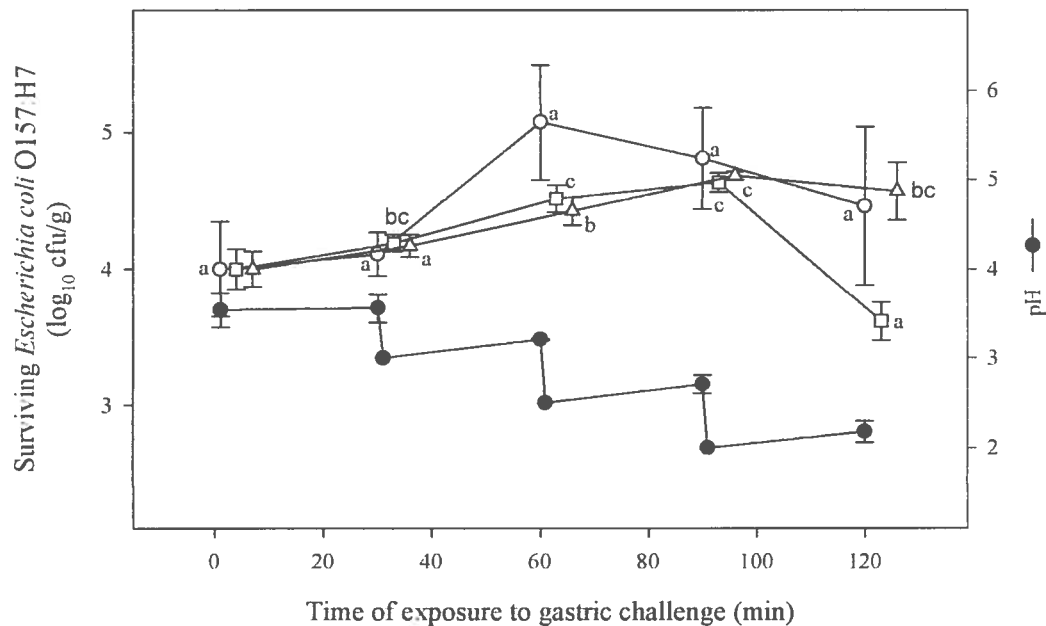


Fig. 2. Survival of *E. coli* O157:H7 cells experimentally inoculated in dry sausage during a gastric challenge under dynamic conditions. Values reported are the average of at least two independent experiments carried out in duplicate. Bars represent standard deviations. Open circles, squares and triangles represent strains F-90, 5-1 and ATCC 43894, respectively. Data represent total counts for injured and uninjured cells measured on MSA after resuscitation on TSA plates. For the same strain, means bearing identical letters are not significantly different ($p > 0.05$).

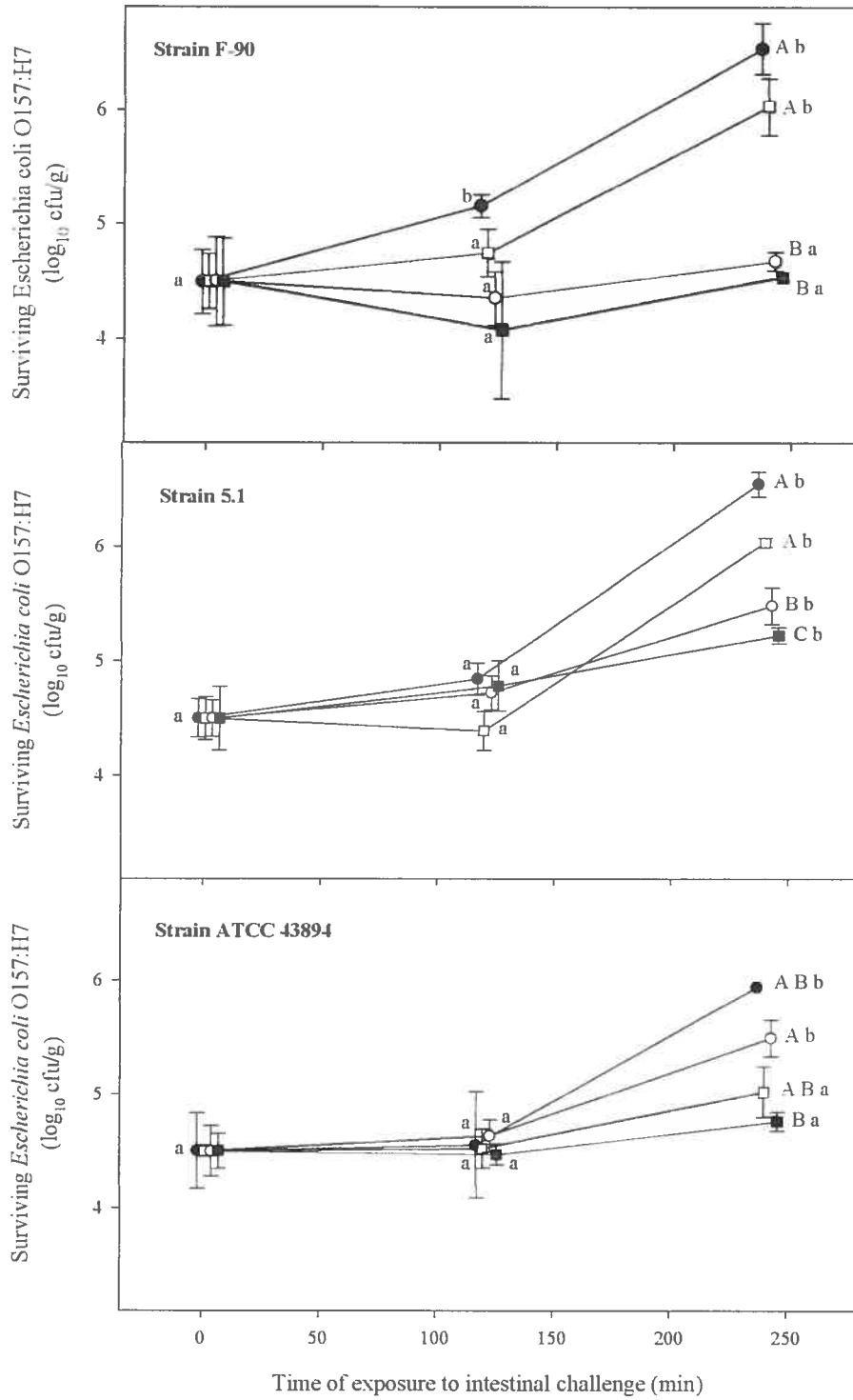


Fig. 3. Survival or growth of *E. coli* O157 in pancreatic juice following 30, 60, 90 and 120 min of prior exposure to gastric challenge under dynamic conditions. Values reported are the average of at least two independent experiments carried out in duplicate. Filled circles, open squares, open circles and filled squares are for cells previously challenged for 30, 60, 90 and 120 min in the gastric juice. Bars represent standard deviations. Data represent total counts for injured and uninjured cells measured on MSA after resuscitation on TSA plates. For the same gastric treatment, means bearing identical lower case letters are not significantly different ($p > 0.05$). For the same intestinal challenge time, means bearing the same upper case letters are not significantly different ($p > 0.05$).

3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article 3

Shiga-like toxin production by sausage-borne *Escherichia coli* O157:H7 in response to a post processing *in vitro* digestion challenge

F. Naim¹, A. Houde², D. Leblanc², S. Messier¹, L. Saucier², G. Piette^{2*}

¹GREMIP, Département de pathologie et microbiologie, faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada ; ² AAC – Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments, 3600 boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8E3 Canada

Article en préparation pour soumission dans Journal of Food Protection

Abstract

In order to study the effects of the fermentation-drying process and the subsequent *in vitro* digestion challenge on Shiga-like toxins (Stx) production by *Escherichia coli* O157:H7, dry sausages inoculated during the formulation step with pure cultures of the stains 5-1 and ATCC 43895 (ca. 2×10^7 CFU/g) were submitted to a minimum (30 min, pH between 3.1 and 3.5) and a maximum (120 min at decreasing pH conditions) gastric challenge, followed by a 240 min pancreatic challenge at pH 8.0 and 37°C. At gene expression level, RT-PCR performed on extracts from inoculated, digested and undigested sausages produced bands for both *stx-I* and *stx-II* mRNA, confirming that the post-stress expression of these two genes has occurred. The production levels of Stxs were evaluated with the standard Vero cytotoxic test on freshly seeded cell cultures. Titration of decimally diluted *E. coli* O157:H7 overnight filtrates showed that Stx production, as well as cytotoxic response by Vero cells (extent of monolayer disruption), were highly dependent on pathogen concentration. Stx production increased as a result of the fermentation-drying procedure, and digestion further enhanced this production. In addition, more severe cytotoxic responses were induced when Vero cells were co-incubated with filtrates from digested sausages. The cytotoxic response was also affected by the severity of the gastric challenge to which the pathogen cells have been exposed (undigested < minimal gastric challenge < maximal gastric challenge). The sub-lethal stress imposed by the fermentation-drying procedure and subsequent digestion of ingested food (i.e. contaminated sausages) may affect the degree to which the surviving *E. coli* O157:H7 cells express their virulence *in vivo*.

Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is a serious foodborne pathogen which can cause a spectrum of illnesses including mild diarrhea, hemorrhagic colitis, and the bloody diarrhea-associated form of the hemolytic uremic syndrome, a life-threatening complication of the disease (9, 11). Virulence markers of *E. coli* O157:H7 include intimin and its receptor, Tir; hemolysin; the locus of enterocyte effacement (LEE) and the O157 lipopolysaccharide antigen (6, 22). However, the pathogenicity of the organism relies mainly on the production of one or both of the two Shiga-like toxins (Stx), which are thought to play a critical role in the lesions seen in the colon and kidneys of infected humans (6, 23).

Possession of *stx* gene is a consistent virulence marker of which the expression is affected and regulated by various environmental and stress conditions. Previous studies have indicated that Stx production is repressed by high levels of iron and reduced temperature (16, 21). Bucnic and Avary (1) observed that Stx production at 37°C was not affected by cold-storage in nutritious menstruum, but was increased following cold storage under starvation conditions, and heat-acid shocks enhanced further this production. Other investigators (13) reported that, while aeration enhanced both mRNA expression and subsequent Stx production, acid adaptation and starvation enhanced Stx-II toxin mRNA levels, but did not affect post-stress toxin production.

From the above it may be concluded that various sublethal stresses, as those encountered during food processing, may affect subsequent expression of virulence

determinants in food-borne pathogens. When considering the sausage-contaminating *E. coli* O157:H7, it is clear that such pathogen has undergone acidic and osmotic stresses during the fermentation and drying phases, respectively (Hurdle effect theory) (14). Once ingested, the micro-organism must further face a variety of exposures to acid and non-acid constituents of the digestive secretions. Interest is growing regarding how this variety of environmental factors, both within the food and the host, may affect the degree to which the surviving cells express their virulence *in vivo*.

We have shown in a previous *in vitro* digestion study (Naim *et al.*, submitted) that the gastric challenge caused sublethal damages to *E. coli* cells, inoculated during the formulation of the sausage batter, and that subsequent pathogen growth during the pancreatic challenge occurred for the first fractions released from the stomach, but not for the fractions submitted to the most severe gastric challenge. The present investigation expanded upon our previous survival study and examines the effects of the stress conditions imposed by the sausage fermentation-drying process and subsequent *in vitro* digestion challenge on the cytotoxic potential of the surviving *E. coli* O157:H7 cells. The study provides data in order to better characterize the food safety implications associated to accidentally contaminated dry sausages.

Materials and Methods

Organisms and cultures. *E. coli* O157:H7 strain 5-1, from the Vancouver outbreak of 1999, was provided by the Canadian Food Inspection Agency (Burnaby Laboratory, BC). Strain ATCC 43895, a raw hamburger meat isolate implicated in

hemorrhagic colitis, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA).

The salami isolates 5-1 was provided as a pure culture on slant agar and kept at 4°C for a maximum of 48 h. Stock culture was prepared by streaking individual colonies onto MacConkey sorbitol agar (MSA; Oxoid, ON, Canada), and incubating at 37°C for 24 h, aerobically. Three *E. coli* O157:H7 colonies (white, non-sorbitol fermenting) were plated as tight streaks on fresh MSA to form confluent growth. After 24 h of incubation at 37°C, the cells were harvested using sterile swabs, suspended in tryptone soya broth (TSB; Oxoid) supplemented with glycerol (10% vol/vol, final concentration), and maintained at -80°C in 0.15 ml aliquots. The ATCC strain, provided as a freeze-dried culture, was first suspended in TSB, then streaked on MSA plates and incubated aerobically for 24 h at 37°C, prior to preparing stock cultures.

Working cultures were prepared by growing *E. coli* O157:H7 overnight at 37°C (with shaking at 150 rpm) in individual test tubes containing TSBG (TSB supplemented with glucose, 1% wt/vol final concentration), with two consecutive daily transfers. The cells were then harvested by centrifugation at $1\ 880 \times g$ for 20 min at 4°C, washed twice and suspended in peptone water (PW; Difco; 0.1% wt/vol final concentration) before use in the experiments. Cell counts were evaluated by enumeration on duplicate MSA plates, after appropriate dilutions in PW. These working cultures were subsequently used for inoculation of sausage batter.

Vero cell line. Unless otherwise specified, all culture media and reagents used in the Vero test were purchased from Invitrogen (ON, Canada). Stocks of the continuous cell line Vero, provided by the Canadian Food Inspection Agency (St-Hyacinthe Laboratory, QC, Canada), were prepared in EMEM medium with Earl salts (Eagle's Minimal Essential Medium with Earl salts) containing 10% FBS (fetal bovine serum) and 10% DMSO (dimethyl sulfoxide), and maintained in liquid nitrogen. Working cultures were prepared by growing Vero cells as monolayers at 36.5°C in a 5% CO₂ atm.

Simulated environments. Artificial saliva was prepared as follows (25): 100 ml each of 25 mM K₂HPO₄, 24 mM Na₂HPO, 150 mM KHCO₃, 100 mM NaCl, and 1.5 mM MgCl₂ were mixed together. To this were added 6 ml of 25 mM citric acid and 100 ml of 15 mM CaCl₂. The pH was adjusted to 6.7 with NaOH or concentrated HCl and the volume made up to 1 liter. The medium was sterilized by autoclaving, and when it reached ambient temperature, A-amylase (Sigma-Aldrich Canada Ltd, ON, Canada) from human saliva and lysozyme (Sigma-Aldrich) from chicken egg white were added at 1g/liter and 0.1g/liter respectively (final concentrations) (4).

The artificial gastric juice was prepared as described by Molly *et al.* (18) to contain (g/liter, final concentrations): glucose, 0.4; yeast extract, 3.0; bacto peptone, 1.0; mucin, 4.0; cysteine, 0.5; NaCl, 0.08; NaHCO₃, 0.4; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; CaCl₂·2H₂O, 0.008; MgSO₄·7H₂O, 0.008; pectin, USP, 2.0; xylan, 1.0; starch soluble, 3.0; and tween 80, 1 ml/liter. The medium was adjusted to pH 2.0 with concentrated HCl (12 N) and was sterilized by autoclaving. The pH of the medium was tested

again following sterilization and equilibration to room temperature, and generally, no adjustment (with HCl or NaOH) was required. Right before the assay, 3 g/liter of pepsin (P-7000; Sigma-Aldrich) (2) was added to the medium.

The pancreatic juice has mainly the same composition as the gastric juice, except that pancreatin and bile extracts (Sigma-Aldrich) were added after raising the pH to 8.0 (NaOH 5 N) at 0.3% and 0.1%, respectively.

Manufacture and inoculation of dry sausages. Sausages were manufactured in a 65-m² biosafety level II pilot plant for meat processing (Faculty of Veterinary Medicine of Montreal University, Saint-Hyacinthe, QC, Canada). Coarse ground (6 mm plate) pork boneless picnics, ground beef 90% lean and fresh pork back fat were purchased locally and kept at about 4°C until batter preparation. Back fat was ground through a 6 mm plate shortly before use in sausage formulation. Formulation of the batter was calculated with the Least Cost Formulator Blending System software (Least Cost Formulation Ltd, Virginia Beach, Va.).

Raw batters were prepared in 2-kg batches that always contained 25% beef, while the remaining portion consisted of pork trimmings, pork back fat, and a commercial spice and salt mixtures (BSA Q11412, BSA Inc., Montreal, QC, Canada), NaCl, and NaNO₂, to obtain a target composition of 20% fat, 4% NaCl, 120 ppm of NaNO₂, and 80 ppm of NaNO₃. The ground meat mix was inoculated with pure cultures of the *E. coli* O157:H7 strains 5-1 or ATCC 43895, at final concentrations of ca. 2×10^7 CFU/g, as recommended by Nickelson *et al.*, (19). The batters were prepared in a 5-

pound capacity stand mixer (K5SSWH model; KitchenAid, Greenville, Ohio, USA), with a 4-min cycle (1 min each for ground raw meats, *E. coli* inoculum, the spice mixture, and NaNO₂). A starter culture (Rosellac A, Rosell Institute, Montreal, Quebec, Canada), composed of *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus varians*, and *Pediococcus* spp. hydrated in distilled water (15 g in 75 ml), was also added, and mixing continued for one additional minute. Negative controls consisting of uninoculated sausages were also prepared similarly.

The batter was then stuffed into 30-mm flat diameter collagen casings (BSA Inc.) to form raw sausages at least twice as long as wide. Temperature of the batter after stuffing was typically 10 to 11°C, and no smearing was observed. Fermentation was carried out at 24 ± 0.1°C (Arcos B130 fermentation-drying unit; Arcos S.a.r.l., France; 20 kg capacity), at a relative humidity (RH) of 80 to 85% (minimum-maximum preset values) to obtain a target pH value of 5.0 (actual pH 4.9 ± 0.1), which typically took 24 h. Sausages were subsequently dried for seven days at 14.0 ± 0.5°C in the drying compartment of the Arcos B130 unit, which was adjusted to initiate and interrupt the drying phase every time RH values reached 80% and 70%, respectively. Drying resulted in water activity (a_w) values of 0.91 ± 0.02.

Physico-chemical analysis. The moisture content of raw meat was determined with a CEM AVC80 microwave moisture analyzer (CEM Corporation, Matthews, N.C.). Fat and protein contents were measured instrumentally, with the TFE-2000 and FP-428 analyzers (Leco Corporation, St. Joseph, MI), respectively. The a_w value was determined with a chilled-mirror dewpoint type a_w -meter (Aqualab CX2, Decagon

Devices, Pullman, WA). The pH of the digestive juices was measured with an OAKTON pH/mv/°C meter (Cole Parmer Labcor Inc., QC, Canada), while the pH of sausages was measured with a Sentron pH meter (model 3001, Exeltec Inc., QC, Canada), equipped with Sentron ion-sensitive field effect transistor surface or penetration probes.

Microbiological analysis. Sausages (two sausages per sampling point), including non-inoculated controls, were tested for viable *E. coli* O157:H7 by dilution and surface plating prior to stuffing, and after drying. At each sampling time, two 10-g portions of the batter or two 10-g composite of cross-sectional sausage slices were aseptically transferred to Whirl pack stomacher bags (VWR, Montreal, QC, Canada) containing 90 ml PW homogenized for one min in a reciprocal blender (400c stomacher, VWR) at maximum speed, and serial dilutions of the homogenates were spread on MSA plates (100 µl aliquots) for the enumeration of *E. coli* O157:H7 cells after a 24 ± 2 h aerobic incubation at 37°C. The identities of three presumptive *E. coli* O157:H7 colonies (white, non-sorbitol fermenting) were subsequently confirmed by biotyping (API-20E, BioMerieux, Montreal, QC, Canada) and serotyping (O157 agglutination test kit; Difco).

***In vitro* digestion tests.** Digestion challenge was performed in a closed system (8) in which substrate (food matrix) and enzymes were in close contact, with no removal of digestion products. Optimal pH and temperature were used for each enzyme, or mixture of enzymes, and reactions were stopped by raising or decreasing the pH (24). The digestion procedure was realized according to the dynamic digestion experiment

previously described by Naim *et al.*, (submitted). Briefly, two inoculated sausages were aseptically chopped into small pieces, and thirty-g portions were subsequently transferred to Whirl pack stomacher bags (VWR) and homogenized for 1 min in presence of 30 ml of artificial saliva, to simulate mastication. The gastric digestion was initiated at 37°C by adding 240 ml of artificial gastric juice (pre-adjusted to pH 2 with HCl 12 N) to the homogenate. The challenge proceeded for a maximum of 120 min with periodic (every 15 min) mixing of the bag contents by hand massaging for about 10 sec. To compensate for the buffering effect of the meal, the pH was reduced to 3.0, 2.5 and 2.0 at 30 min, 60 min, and 90 min respectively, which mimics the gradual re-acidification of the stomach content after ingestion of a meal (17). Concurrently, 50 ml portions of the gastric suspension were taken off the stomacher bag after 30 and 120 min, and further exposed to the pancreatic challenge (pH 8.0). This corresponded to the fractions of the gastric content released after exposure to the minimum and maximum gastric challenge to which the sausage would be exposed, respectively. The suspension was incubated aerobically at 37°C for an additional 4h and periodically homogenized, as described above. Viable counts were performed following the pancreatic challenge, by surface plating the appropriate dilutions in PW on TSA and SMAC.

Preparation of supernatant and Vero cell assay. Supernatant from inoculated but not digested (10 g / 90 ml TSBG), and inoculated and digested sausages (minimum and maximum gastric challenge), were used to evaluate the Stx production and cytotoxic effect of Stx on Vero cell monolayers. One ml from each suspension was centrifuged for 10 min at 12 000 × g and 4°C. The supernatant, containing the toxins,

was filtered through a 0.22 μm membrane using sterile syringes (VWR). The filtrate was pre-frozen for 30 min at -80°C then conserved at -20°C for subsequent use in Vero tests (for a maximum of two weeks). Positive controls were prepared from filtered supernatants of overnight cultures of the strains 5-1 and ATCC 43895 (grown at 37°C). Negative controls, consisting of freshly seeded Vero cells, and filtrates from uninoculated dry sausages homogenized in TSBG, were also prepared.

Shiga-like toxin activity was assayed as described by Mann (15), with the exception that 24 wells plastic dishes (Falcon Multiwell 24 well, Beckton Dickinson, ON, Canada) were used with 0.75 ml of EMEM medium enriched with 5% fetal bovine serum. To the first well, 0.25 ml supernatant filtrate were added and serially diluted (1/5). Freshly trypsinated Vero cell monolayers were then seeded at ca. 4×10^5 cells / ml (0.75 ml), and dishes were incubated at 36.5°C under 5% CO_2 atm. Filtrates of the overnight bacterial cultures were decimally diluted in TSBG and tested on Vero monolayers to determine the a correlation between the toxin level and the bacterial cell density. The cell cultures were checked for cytotoxic effects (detached and rounded cells) under inverted microscope following 24 and 48 h of incubation. Morphological effects were recorded as ≤ 25 , 50, 75 or $\geq 90\%$ of cells affected, as compared to negative controls. The concentration of SLT in each sample was expressed in arbitrary units (AU), i.e. the reciprocal of the highest dilution of the sample producing morphological change. Cultures were then fixed with formaline and stained with violet crystal for reference or photographs.

Nucleic acid extraction. Two hundred ml of pancreatic suspensions from inoculated undigested and digested sausages (maximum gastric challenge, 240 min pancreatic challenge) were centrifuged for 15 min at $4\,900 \times g$, which resulted in a two layer pellet consisting of meat particles (down layer) and bacterial cells (upper layer). The supernatant and the fat layer were discarded. The bacterial pellet was carefully suspended in 2 ml of PW, and transferred to ribonuclease free Eppendorf for 5-min subsequent centrifugation at $12\,000 \times g$ and 4°C . The supernatant was removed, cells of the resulting pellet (ca. 3×10^6 CFU/ml) were lysed, and RNA was selectively extracted using Trizol per the manufacturer's instructions (Gibco; Life technologies, Gaithersburg MD). Briefly, samples were mixed with chloroform (0.2 ml) and centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min for phase separation. The top phase containing RNA was removed and precipitated with isopropanol (0.5 ml) in the presence of 0.5 μl of glycogene, to assist in the RNA precipitation. Samples were centrifuged for 10 min at $12\,000 \times g$, and the RNA precipitates were subsequently washed with 75% ethanol (centrifugation for 5 min at $7\,500 \times g$). Following precipitation, the RNA pellets were air dried for 15-20 min under a biological hood.

DNase treatment. Dried RNA pellets were each resuspended in 50 μl of molecular grade water containing RNasin RNase inhibitor (1% vol/vol; Ambion Inc., Woodward Austin, TX). The rehydrated pellets were heated at 95°C for 3 min in a water bath, to allow the denaturation of coextracted DNA, and mixed with 0.1 volume of 10 X DNase I buffer and 3 μl of DNase I (Ambion). Following 60 min of incubation at 37°C , 0.1 volume of DNase Inactivation Reagent was added. The inactivator was subsequently pelleted by centrifugation (1 min at $10\,000 \times g$), and the

supernatant containing pure RNA used as template for the cDNA synthesis and amplification by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Nucleic acid amplification. One Step RNA PCR kit (AMV) and two primer sets targeting specific sequences of 349 and 404 pb for *stx-I* (EVT-1, EVT-2) and *stx-II* and its variants (EVS-1, EVS-2), respectively, were used in this study (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan). A 50 μ l solution was prepared per PCR reaction to contain 5 μ l of 10 \times buffer (1 X), 20 μ l of molecular grade water, 10 μ l of MgCl₂ (5 mM), 5 μ l of dNTP mixture (1 mM), 1 μ l of ribonuclease inhibitor (0.8 U / μ l), 1 μ l of AMV optimized Taq polymerase (0.1 U / μ l), 1 μ l of primers (19 pmol / μ l), 1 μ l AMV-RT reverse transcriptase, and 1-5 μ l of RNA extract. Amplifications were performed in a DNA thermal cycler (Eppendorf, VWR) programmed for 30 min reverse transcription at 60°C, followed by 35 cycles with 45 sec denaturation at 94°C, 45 sec annealing at 55°C, and 1 min extension at 72°C. After RT-PCR amplification, the cDNA samples were analyzed by agarose gel electrophoresis, visualized by UV transilluminator, and photographed. A molecular size marker, 100 bp ladders, was included in each gel.

Statistical analysis. Triplicate experiments of *in vitro* dynamic digestion were conducted for inoculated sausages originating from 3 independent productions.

Results

Sausage fermentation and drying resulted in a $2.13 \pm 0.08 \log_{10}$ CFU/g reduction in *E. coli* O157:H7 numbers from the initial concentration (ca. 2×10^7 CFU/g) in the raw batter (not shown). Therefore, the concentrations of the pathogen initially exposed to

the digestion challenge ranged between 5.12 to 5.23 log₁₀ CFU/g (or 4.12 to 4.23 log₁₀ CFU/ml). Analyses of the uninoculated control sausages before fermentation and after drying by direct plating on SMA revealed that none of them contained indigenous *E. coli* O157:H7, indicating that the raw meat used in manufacturing was exempt of the pathogen, and that no cross contamination had occurred during processing.

Mixing the sausage portion massaged in synthetic saliva with the synthetic gastric juice resulted in an initial pH of 3.1 ± 0.16. Increases in pH ranging from 0.2 to 1.2 were observed between two pH adjustments, done every 30-min (Table 1).

The toxins gene expression was detected by RT-PCR using specific primers for *stx-I* and *stx-II*. Results in Fig.1 shows that RT-PCR for extracts from overnight cultures of the two strains tested (positive controls) produced bands for both *stx-I* and *stx-II* mRNA. RT-PCR amplification products for both *stx-I* and *stx-II* were also obtained with all the inoculated sausage samples. No bands were produced for extracts from uninoculated sausages as well as from negative control for PCR reactions.

The Vero cell assay has been used as the standard method for Stx titration and the evaluation of the extent of monolayer destruction (cytotoxic effect). Preliminary experiments with filtrates from overnight cultures indicated that the two strains of *E. coli* O157:H7 tested (positive controls) induced Vero cell death after 2 days of co-incubation. Dead cells, which were visible under inverted microscope as detached and floating, were eliminated with the culture medium prior to the formaline fixation step

Titration of decimally diluted filtrates from overnight cultures indicated that the cytotoxic effect on Vero cells was highly dependent on the pathogen concentration, with maximum monolayer destructions noted with undiluted filtrates. The extent of destruction then decreased concurrently with the decrease in the pathogen concentration, to reach undetectable levels with dilutions higher than 10^{-4} (corresponding to pathogen levels $\leq 5 \log_{10}$ CFU/ml). Consequently, lower titers were obtained with higher decimal dilutions, and the highest dilutions inducing 50% of destruction were 10^{-3} for 5-1 and 10^{-2} for ATCC 43895, corresponding to respective concentrations of about 6 and 7 \log_{10} CFU/ml (Table 2).

E. coli O157:H7 enumeration after the pancreatic challenge indicated that pathogen growth occurred for the cells in sausages challenged for 30 min in the gastric juice, corresponding to the first fractions released before the acidification of the gastric content. However, no growth was observed for the fractions submitted to the maximum gastric digestion (120 min, decreasing pH; Table 3).

The effect of the pathogen concentration was not apparent with filtrates from inoculated sausages. Incubation in presence of filtrates from undigested sausages (4.12 ± 0.11) caused about 50% destruction to Vero monolayers (titer of 25 AU), while almost 100% viability was observed after 2 days incubation with filtrates from optimally-grown overnight *E. coli* cultures diluted to similar concentration levels (10^{-5} decimal dilution) (Table 3). Globally, titers were higher with filtrates from digested sausages than from undigested ones, regardless of the pathogen concentration. In spite of the differences in pathogen levels (between 1.44 and 1.66 \log_{10} CFU/ml),

similar titers were obtained with filtrates from minimum and maximum digestion challenges. A global evaluation of the cytotoxic effects indicated that the extent of monolayer destruction was highly related to the severity of the stress to which the pathogen cells have been exposed. Accordingly, the following order was obtained: overnight cultures < undigested sausages < minimum gastric digestion < maximum gastric digestion. Differences in cytotoxic effects are well illustrated in Fig. 3.

Discussion

To extend our earlier work on the survival of sausage-borne *E. coli* O157:H7, we investigated the influence of the dry-sausage preparation procedure and subsequent in vitro digestion challenge on the *stx* genes expression and the production of active Stx.

Detection of mRNA expression by RT-PCR is dependent on the abundance of the selected target gene and on the presence of inhibitors in the food matrix that may prevent sufficient extraction of template for amplification or may inhibit the amplification process (16, 25). Enrichment procedures can overcome this obstacle, but was not possible in the present study, where the cell density and the environmental conditions prevailing in the final matrix are key factors. By adding a pre-centrifugation step, it was possible to eliminate food particles and concentrate the cells without prior enrichment.

Data of the RT-PCR indicated that both *stx-I* and *stx-II* mRNA were expressed by cells from digested and undigested extracts. The amplified fragments corresponded to the targeted cDNA and were not due to contamination or co-extraction of DNA.

Experiments in culture broth indicated that the amount of toxin was related to the pathogen concentration, with highest titers obtained at lower dilutions. Cell concentrations between 6.3 to 7.1 log₁₀ CFU/ml were required to induce about 50% monolayer destruction, but negligible cytotoxic effect (< 10% monolayer destruction) was detected at 5.1-5.3 log CFU/ml (corresponding to the decimal dilution 10⁻⁴) after 2 days of co-incubation. These data are in agreement with previous reports indicating that the amount of toxin was related to the bacterial cell concentration (20), and that Stx could not be detected until viable counts in the broth reached 6.3-7 log CFU /ml (1).

The Stx production increased as a result of the fermentation-drying procedure (based on procedures commonly used by industry in Eastern Canada). This increase is likely the result of the regulation of *stx* genes by the minimal physical and chemical treatments used (such as the synergistic or hurdle effects of salt, nitrite, nitrate, reduced water activity, acidic conditions (pH ≤ 5.3) and temperature shift (13)), which resulted in incomplete pathogen inactivation (2 log₁₀ CFU reduction / g) and generation of sublethally injured cells. These data are supported by previous reports indicating that individual or combined sublethal factors, e.i., temperature (20), menstruum composition (19), growth pH (Duffy *et al.*, 2000), starvation and shocks (heat-acid; 1), aeration and acid adaptation and starvation (12), may affect the

subsequent toxin production by *E. coli* O157:H7. Whether and how the different stresses applied by the manufacturing process and the cellular mechanisms involved in the regulation of Stx production was not addressed in the present study.

We have shown in a previous related study on the survival during the gastro-intestinal digestion of sausage-borne *E. coli* O157:H7 (Naim *et al.*, submitted) that longer exposure to decreasing pH conditions in the gastric juice inhibited subsequent growth during the pancreatic challenge, which explains the differences seen in the final pathogen counts between minimally and maximally digested sausages.

Globally, higher Stx production levels were detected in filtrates from digested sausages than from undigested ones. Whether increase in toxin levels in the cells submitted to the minimum gastric digestion is due to the population growth and/or to increase in production as a result of additional stress sources (e.i. acidic pH) is not clear. However, data generated by co-incubation of Vero cells in presence of filtrates from maximally digested sausages demonstrates that Stx levels increased as a result of the gastric challenge, and increases were related to the severity of the challenge in term of acidic conditions and exposure time. Increases likely reflect release of preformed toxins following cell death and membrane lyses (9) and/or increase in toxin production. Cell death occurred to some extent in the populations released with the last fractions of the gastric contents (maximum gastric digestion). As well, increases in Stx levels may be the result of an SOS-mediated induction of toxin synthesis. Low pH has a recognized capacity to induce SOS response by causing damage to bacterial DNA and activating the multifunctional RecA protein (3, 27).

performed toxins following cell death and membrane lyses (10) and/or increase in toxin production. Cell death occurred to some extent in the populations released with the last fractions of the gastric contents (maximum gastric digestion). As well, increases in Stx levels may be the result of an SOS-mediated induction of toxin synthesis. Low pH has a recognized capacity to induce SOS response by causing damage to bacterial DNA and activating the multifunctional RecA protein (3, 28). Activated RecA causes the degradation of two key repressor proteins, LexA and CI. The decrease in pool of LexA results in the increased expression of SOS-regulated genes, required for DNA repair (5, 27), while cleavage of the CI phage repressor/activator protein induces expression of the toxin genes on the bacteriophages hosting *stx-I* or *stx-II*. An SOS response is also followed by bacterial lyses and release of toxins (10, 12).

The study indicated that Stx productivity of *E. coli* O157:H7 is enhanced after exposure to several challenges in a raw, as applied in this study. Awareness is then growing that the variety of stress encountered both within the food and particularly the host could exacerbate EHEC infections by increasing dissemination of *stx* genes and releasing preformed toxins, which are proven risk factors for progression from colitis to HUS.

Acknowledgments

This work was made possible through a grant from the Conseil des Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec of the Government of Quebec.

References

1. Bucnic, S., and S. M. Avery. 1998. Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 15: 319-328.
2. Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.
3. Choi, S. H., D. J. Baumber, and C. W. Kaspar. 2000. Contribution of *dps* acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 3911-3916.
4. Cornelius, C., C. Lentren, and A. Wink eds. 1981. Geigy Scientific Tables. Units of measurement. Body fluids, composition of the body. Nutrition, Volume 1. ISBN, USA.
5. Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 429-453.
6. Doyle, M. P., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. *In* Food Microbiology – Fundamental and Frontiers, M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (Ed). ASM Press, Washington, D. C.

7. Duffy, L. L., F. H. Grau, and P. B. Vanderline. 2000. Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with foodborne disease and meat. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 83-89.
8. Gauthier, S. F., C. Vachon, and L. Savoie. 1986. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *J. Food Sci.* 51: 960-964.
9. 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: 60-97.
10. Kanbar, A., E. Rahal, and G. M. Matar. 2003. *In vitro* inhibition of the expression of *Escherichia coli* O157:H7 genes encoding the Shiga like toxins by antimicrobial agents: potential use in the treatment of human infections. *J. Appl. Res.* Available at: <http://www.jrnlappliedresearch.com/articles/Vol3Iss2/Matar.htm>.
11. Kaper, J. B., and A. D. O'Brien, eds. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
12. Kimmitt, P. T., C. R. Harwood, and M. R. Barer. 2000. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 458-465.

13. Leenanon, B., D. Elhanafi, and M. A. Drake. 2003. Acid adaptation and starvation effects on Shiga toxin production by *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 66: 970-977.
14. Leistner, L. 1994. Stable and safe fermented sausages world-wide. In "Fermented meats" (G. Campbell-Platt et P. E. Cook, Eds), PP 160-175. Blackie Academic and Professional, New York.
15. Mann, E. 1994. Méthode de detection d'*Escherichia coli* producteur de vérocytotoxine dans des échantillons de viandes crues ou cuites. Manuel des méthodes, salubrité des aliments version 2.0, novembre 1994.
16. McIngvale, S. C., E. Elhanafi, and M. A. Drake. 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 779-806.
17. McLauchlan, G., G. M. Fullarton, G. P. Crean, and K. E. McColl. 1989. Comparison of gastric body and antral pH: a 24 hour ambulatory study in healthy volunteers. *Gut.* 30: 573-578.
18. Molly, K., M. V. Woestyne, I. De Smet, and W. Verstraete. 1994. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganisms-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 7: 191-200.

19. Nickelson, R. II, J. Luchanski, C. Kaspar, and E. Johnson. 1996. Update on dry fermented sausage and *Escherichia coli* O157:H7 validation research. An executive summary update by the blue Ribbon Task Force of the National Cattlemen's Beef Association with the Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison. Research Report no. 11-316. National Cattlemen's Beef Association. Chicago, IL.
20. Palumbo, S. A., A. Pickard, and J. E. Call. 1997. Population changes and verotoxin production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains inoculated in milk and ground beef held at low temperatures. *J. Food Prot.* 60: 746-750.
21. Palumbo, S. A., J. E. Call, F. J. Schultz, and A. C. Williams. 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 58: 352-356.
22. Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
23. Price, S. B., C. M. Cheng, C. W. Kaspar, J. C. Wright, F. J. DeGraves, T. A. Penfound, P. P. Castanie-Cornet, and J. W. Foster. 2000. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 632-637.

24. Savoie, L. 1993. Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of *in vitro* models. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 72:407-414.
25. Söderholm, K. J. M. R. Mukherjee, and J. Longmate. 1996. Filter leachability of composites stored in distilled water or artificial saliva. *J. Dental. Res.* 75: 1692-1699.
26. Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi, and H. Nakanish. 1997. A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Am. Soc. Microbiol.* 63: 4127-4131.
27. Wagner, P. L., D. W. K. Acheson, and M. K. Waldor. 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 1934-1937.
28. Walker, G. C., B. T. Smith, and M. D. Sutton. 2000. The SOS response to DNA damage *In* Bacterial Stress Response, G. Storz, and R. Hengge-Aronis (Eds). ASM Press, Washington, D. C.

Table 1. Time course of pH during the gastric digestion under dynamic conditions.

Time in gastric juice (min)	Measured pH \pm standard deviation	pH adjusted to:
1	3.1 ± 0.2	
30	3.5 ± 0.1	
31		3.0
60	3.5 ± 0.2	
61		2.5
90	3.7 ± 0.2	
91		2.0
120	2.2 ± 0.2	

Table 2. Titration and cytotoxic effect of decimally diluted filtrates from TSBG-grown overnight cultures of *E. coli* O157:H7, 2 days postincubation.

Strain	Dilution (EMEM)	Decimal dilution in TSBG						
		None ^a	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
5-1	1/5	4	4 ^b	3	2	1	-	-
	1/25	4	3	2	1	-	-	-
	1/125	4	2	1	1	-	-	-
	1/625	3	2	-	-	-	-	-
	1/3125	2	1	-	-	-	-	-
	1/15625	-	1	-	-	-	-	-
Titer (AU)		3125	625	25	5	< 5	-	-
ATCC43895	1/5	4	3	2	1	1	-	-
	1/25	4	3	2	-	-	-	-
	1/125	4	2	1	-	-	-	-
	1/625	3	1	1	-	-	-	-
	1/3125	2	1	-	-	-	-	-
	1/15625	1	-	-	-	-	-	-
Titer (AU)		3125	125	25	< 5	< 5	-	-

^a Cell counts of undiluted supernatants were 9.2 ± 0.3 and $9.1 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/ml for the strains 5-1 and ATCC 43895, respectively.

Table 3. Pathogen counts, Stx production and cytotoxic effects on Vero monolayers in response to fermentation-drying and subsequent in vitro digestion

Strain	Treatment	Counts \pm SD (log ₁₀ CFU/ml)	Dilution in EMEM	Cytotoxic effect	Titer (AU)
5-1	Undigested	4.1 \pm 0.1	1/5	2 ^a	5
			1/25	1	
			1/125	-	
			1/625	-	
			1/3125	-	
	Minimum digestion	6.0 \pm 0.1	1/5	4	25
			1/25	2	
			1/125	-	
			1/625	-	
			1/3125	-	
	Maximum digestion	4.3 \pm 0.3	1/5	4	25
			1/25	4	
			1/125	-	
			1/625	-	
			1/3125	-	

ATCC 43895	Undigested	4.2 ± 0.2	1/5	2	5
			1/25	1	
			1/125	-	
			1/625	-	
			1/3125	-	
	Minimum	6.0 ± 0.5	1/5	4	25
	digestion		1/25	3	
			1/125	1	
			1/625	-	
			1/3125	-	
	Maximum	4.6 ± 0.1	1/5	4	25
	digestion		1/25	4	
			1/125	1	
			1/625	-	
		1/3125	-		

^a Code: -, no response; 1, $\leq 25\%$; 2, about 50%; 3, about 75%; 4, $\geq 90\%$ of Vero monolayer destruction.

^b Titer: reciprocal of the highest dilution affecting 50% of Vero cells.

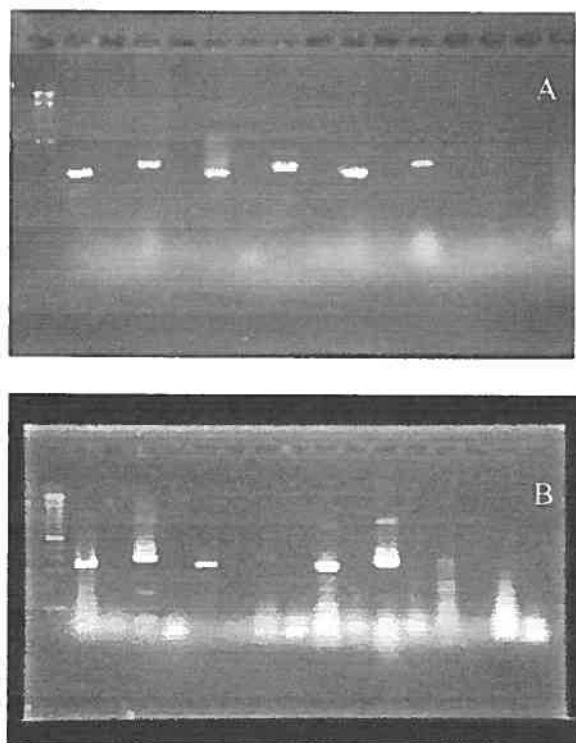


Fig. 1. Amplification of *stx-I* and *stx-II* mRNA for strains 5-1 (A) and ATCC 43894 (B). Lane 1 and 18: 100 bp molecular weight marker, lane 2 through 5 and 19 through 22: extracts overnight cultures; lanes 6 through 9 and 23 through 26: inoculated, undigested sausages; lane 10 through 13 and 27 through 30: digested sausages (maximum gastric digestion); lane 14 through 17: uninoculated sausages; lane 31 through 34: blank. The order for each series of lanes was: RT-PCR for *stx-I*, PCR for *stx-I*, RT-PCR for *stx-II*, PCR for *stx-II*.

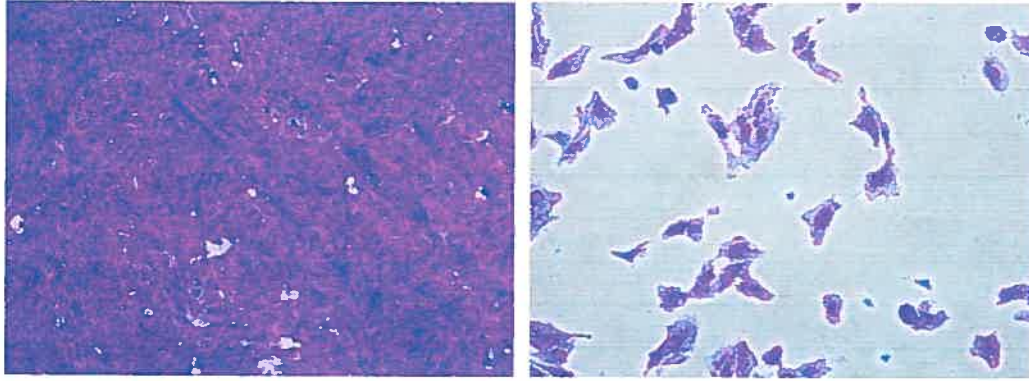


Fig. 2. Freshly seeded Vero cells incubated for 48 ± 2 h in presence of filtrates from:
a) uninoculated sausages (control); b) *E. coli* O157:H7 strain 5-1 grown overnight in TSBG.

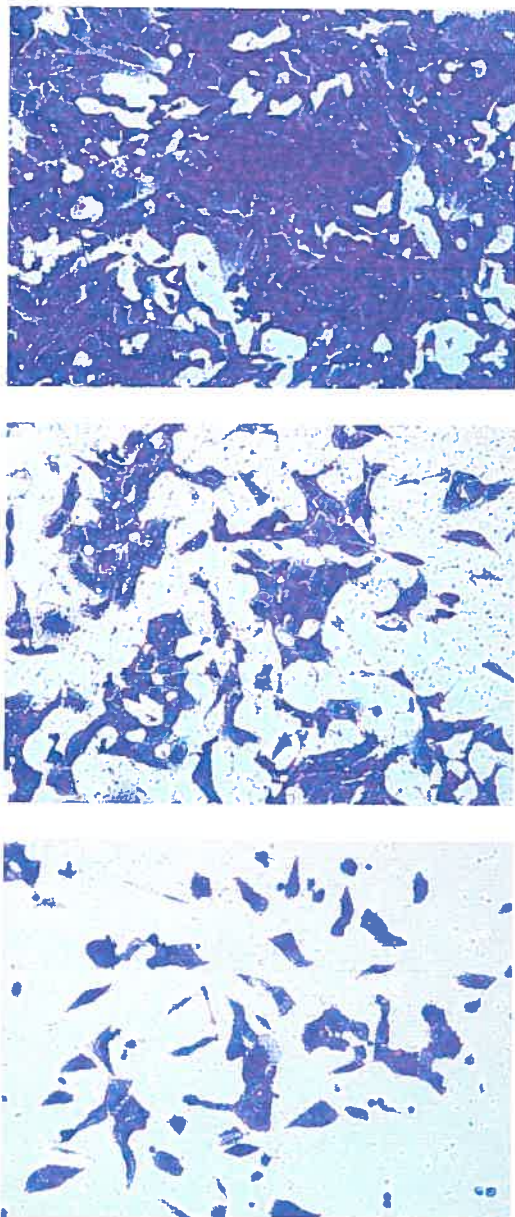


Fig. 3. Cytotoxic response by Vero cells incubated for 48 ± 2 h with filtrates from sausages inoculated with the strain 5-1. a) undigested; b) digested with minimum gastric challenge; c) digested with maximum gastric challenge. Similar results were obtained with the strain ATCC 43895.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

4. 1. Étude modèle de survie de *Escherichia coli* O157:H7 dans le saucisson sec

L'identification du salami sec comme voie de transmission de *E. coli* O157:H7 (Tilden *et al.*, 1996) a été à l'origine d'une réglementation de l'USDA-FSIS (Nickelson *et al.*, 1996), par la suite adoptée par l'ACIA (Santé Canada, 2000). En vertu de cette réglementation, les producteurs nord américains de viandes fermentées sont tenus de valider la capacité de leurs procédés de fabrication à détruire *E. coli* O157:H7 en suivant un protocole officiel de validation recommandé par le FSIS. Ce protocole, basé sur le scénario du pire en raison du manque de données scientifiques et de la gravité de la maladie causée par le micro-organisme, exige que la mèche de saucisse soit inoculée durant l'étape de formulation avec ca. 2×10^7 UFC/g d'un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7 préalablement adaptées à l'acidité par croissance dans un milieu TSB additionné de glucose (1%). Étant donné que les études de validation de procédés impliquent la contamination de l'aliment avec des pathogènes sous conditions contrôlées, les mêmes considérations méthodologiques jugées importantes pour les études d'inoculation et emballage (pack inoculation studies) (Notermans *et al.*, 1993) seront aussi importantes dans les études de validation. Ceci justifie bien l'intérêt de la présente étude à déterminer l'effet du choix des souches, de la préparation de l'inoculum, de la concentration de l'inoculum, et de la procédure d'inoculation sur la survie de *E. coli* O157:H7 durant le procédé de fermentation-séchage sous différentes combinaisons de paramètres (article # 1).

Les résultats d'études précédentes (Benjamin and Datta, 1995; Buchanan and Edelson, 1996; Gorden et Small, 1993; Jordan *et al.*, 1999; Small *et al.*, 1994;

Waterman et Small, 1996;) ont montré que *E. coli* O157:H7 dispose d'une résistance inhabituelle à l'acidité, mais cette résistance dépendait des souches et de l'origine des isolats. La capacité de résister aux conditions d'acidité extrêmes des isolats utilisés pour l'inoculation subséquente de la mèche crue ou des morceaux de viande destinés à la production de saucisses a été étudiée en fonction de l'état de préparation au stress acide (article # 1). Le fait que les trois isolats utilisés soient résistants à l'acidité, qu'ils soient pré-adaptés (TSBG) ou non (BHIB) aux conditions d'acidité modérées (article # 1), n'était pas surprenant. Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas vérifiés, la connaissance des conditions d'induction des systèmes de résistance à l'acidité identifiés chez *E. coli* a permis de conclure qu'au moins un des ces systèmes est inductible par les conditions de croissance utilisées dans la présente étude. Ainsi, la résistance des cellules préparées dans le BHIB sous conditions de métabolisme oxydatif a été conférée par le système *Rpos*-dépendant, activé par l'entrée en phase stationnaire (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995, 1996). Le système *Rpos*-dépendant est réprimé en présence du glucose, mais la fermentation de ce sucre résulte en une acidification du milieu, condition favorable à l'induction des systèmes de décarboxylases glutamate- et arginine-dépendants (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995, 1996). Il en découle que la résistance des cellules préparées dans le milieu TSBG était possible par l'induction du système glutamate-dépendant (pH ~ 5.0 après 24 ± 2 h de croissance), puisque le système arginine-dépendant requiert des conditions d'anaérobiose pour son activation (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). La présence de sources convenables de glutamate dans le milieu d'épreuve, sous forme de caséine et de peptone de soya, rendait possible la décarboxylation et la consommation subséquente des protons, nécessaires au maintien d'un pH interne vital

durant l'exposition à l'acidité extrême de l'environnement externe (Foster, 2000). Ces résultats confirment que la résistance à l'acidité des isolats sélectionnés pour la présente étude ne nécessite pas une pré-adaptation dans des conditions modérément acides et que l'usage d'un inoculum pré-adapté à l'acidité pour l'estimation du niveau d'inactivation de *E. coli* O157:H7 durant la fabrication de saucisses fermentées, tel que recommandé par les agences réglementaires, ne semble pas être d'une grande utilité.

Une des voies majeures de contamination des viandes par *E. coli* O157:H7 se fait par contact direct du contenu intestinal avec la surface du muscle durant l'abattage (Delazari *et al.*, 1998). Plusieurs jours peuvent s'écouler entre la contamination et la transformation de la viande par l'industrie alimentaire et durant cette période, la viande contaminée est en général réfrigérée. D'après Lin *et al.* (1996), la résistance à l'acidité se développe dans le tractus intestinal et, une fois induits, les systèmes de résistance à l'acidité demeurent actifs après plusieurs semaines de conservation à 4°C. Un fait intéressant de la présente étude est que l'inoculation en surface de morceaux de bœuf et leur maintien une semaine à la température de réfrigération (pour simuler le délai moyen de 7 jours entre l'abattage et la transformation) a considérablement réduit la résistance des souches à l'acidité et a résulté en une augmentation additionnelle du niveau d'inactivation du micro-organisme par le procédé (fermentation à 24°C jusqu'à un pH 5.0 à 5.3 et séchage jusqu'à une valeur d' a_w 0.91). Ces résultats mettent en évidence l'importance du choix de la technique pour réaliser des études qui requièrent une évaluation réaliste de la destruction de l'agent

pathogène. Dans le cas particulier d'études destinées à augmenter le niveau de sécurité offert par un procédé, l'inoculation en surface des viandes paraît une meilleure approche.

Il a été suggéré que l'inoculation à un niveau élevé, 7 à 8 \log_{10} UFC/g tel que recommandé Nickelson *et al.* (1996), permettrait au micro-organisme d'outrepasser certaines conditions adverses reliées au procédé, résultant en une sous-estimation de la capacité du procédé à éliminer l'inactiver (Notermans *et al.*, 1993). Stiebing *et al.* (1998) ont observé une augmentation de ca. 1 \log_{10} UFC/g dans l'inactivation des populations de *E. coli* O157:H7 durant la production de saucisses fermentées quand la concentration de l'inoculum a été réduite de 6 \log_{10} UFC/g à 4 \log_{10} UFC/g. Dans la présente étude, la réduction du niveau de l'inoculum à ca. 4.7 \log_{10} UFC/g n'a pas résulté en une augmentation du niveau d'inactivation des population du micro-organisme. Des résultats similaires de l'effet de la concentration de l'inoculum initial (3.7 vs 7.1 \log_{10} UFC/g) sur l'inactivation du micro-organisme par le procédé ont été obtenus par Nissen et Holk (1998). Les différences entre les souches, la formulation des saucisses (particulièrement les épices), et les paramètres sélectionnés du procédé (température, temps, pH, a_w) peuvent être à l'origine de cette divergence entre les résultats des trois études. Dans tous les cas, la différence d'inactivation associée aux concentrations de l'inoculum était toujours inférieure à 1 \log_{10} UFC/g. Ceci permet de conclure que l'inoculation avec une forte concentration, tel que suggéré par le FSIS, n'affecte pas les résultats de la validation vis-à-vis la destruction de *E. coli* O157:H7.

Pour déterminer si la survie durant le procédé de fermentation-séchage est une caractéristique des souches les plus robustes ou des isolats de saucisses associées aux grands épisodes de toxi-infections, des cultures pures ont été inoculées séparément dans la mêlée ou en surface des morceaux de viande destinés à la production. Or les trois souches testées ont montré des niveaux similaires de sensibilité au stress du procédé. Il en découle que la survie de *E. coli* O157:H7 durant la production de saucisses fermentées séchées semble être une caractéristique commune parmi plusieurs souches. Cette conclusion est en accord avec des études précédentes rapportant la survie d'un mélange de souches isolées de produits animaux ou des isolats humains durant les procédés de production de saucisses fermentées (Nissen et Holk, 1998) et fermentées séchées (Glass *et al.*, 1992), respectivement.

Une revue de la littérature scientifique a indiqué que la température et le temps de fermentation peuvent affecter le niveau d'inactivation offert par les procédés. Le modèle mathématique développé par Tomicka *et al.*, (1997) a prédit qu'une longue fermentation à basse température (22°C) réduirait plus le nombre de *E. coli* O157:H7 qu'une courte fermentation à température élevée (37°C). De plus, Hinkens *et al.*, (1996) ont rapporté que la garde additionnelle de 4-7 jours à la température de fermentation peut dans certains cas augmenter le niveau d'inactivation du micro-organisme durant la fabrication de saucisses. Dans le cadre de la présente étude, les effets de la température/temps de fermentation, de la période de garde en pré-séchage ainsi que du niveau de séchage ont été évalués séparément ou en différentes combinaisons dans le but d'atteindre les $5\log_{10}$ UFC/g d'inactivation recherchés. De

façon globale, les niveaux de réduction obtenus par le procédé (cette étude) étaient de $2.17 \pm 0.44 \log \text{ UFC/g}$ quand le séchage a été interrompu à a_w 0.91, que la fermentation soit menée à 24°C (48 h) ou à 37°C (24 h). Cependant, l'effet de la température de fermentation a été observé suite à la phase de garde (5 jours) en préséchage, où une augmentation significative du niveau de destruction a été obtenue pour les saucisses fermentées à 37°C (une croissance abondante de moisissure a été observée durant la période de garde à cette température) et non pour ceux fermentées à 24°C. Le choix de la température de fermentation a aussi influencé les résultats obtenus par Hinkens *et al.* (1996), puisque l'effet positif vis-à-vis de la destruction du micro-organisme était évident pour les produits fermentés à haute température (43°C), mais les résultats restaient non concluants pour les produits fermentés à des températures relativement basses (21°C).

Parmi toutes les combinaisons de processus testés, seul le séchage extensif (a_w 0.79) suivant la fermentation et la garde à 37°C a pu livrer les $5 \log_{10} \text{ UFC/g}$ (effectivement $> 4.90 \pm 0.85 \log_{10} \text{ UFC/g}$) requis par les agences de réglementation. Cette combinaison de paramètres est particulièrement utile pour les rares produits extrêmement séchés, si le développement de la moisissure durant la période de garde à température élevée peut être contrôlé.

Les résultats mentionnés ci-dessus et ceux des études précédentes indiquent qu'un traitement thermique doux, précédant le séchage, demeure une solution pratique pour produire des saucisses commerciales régulières ($a_w \geq 0.85$) sécuritaires vis-à-vis de

E. coli O157:H7. L'entreposage à des températures supérieures à 15°C reste actuellement l'alternative de choix pour les produits ne tolérant pas le chauffage sans perte inacceptable de qualité.

4. 2. Analyse du risque associé à la consommation de saucisses contaminées par *E. coli* O157:H7

Le transit gastrique est considéré comme un facteur majeur de défense contre les agents pathogènes entériques ingérés avec la nourriture ou l'eau (Smith, 2003). Bien que la majorité de ces agents pathogènes est sensible à l'acidité gastrique, plusieurs d'entre eux (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium et *Shigella flexneri*) ont développé des mécanismes qui leur permettent de s'adapter aux conditions acides rencontrées dans l'environnement et les aliments (Foste, 2000). Dans le cas particulier de *E. coli* O157:H7, sa capacité de survivre dans des aliments acides a été rapportée par plusieurs chercheurs (Besser *et al.*, 1993, Glass *et al.*, 1992, Miller et Kaspar, 1994, Zhao *et al.*, 1993). De plus, des études utilisant des cellules préparées dans des milieux de culture pour inoculer du suc gastrique synthétique ou des milieux acidifiés, jusqu'à des valeurs de pH comparables à ceux de l'estomac en conditions de jeûne (pH 2.0 à 3.0), ont suggéré que le transit gastrique est insuffisant pour détruire *E. coli* O157:H7 (Arnold et Kaspar, 1995, Benjamin et Datta, 1995, Gorden et Small, 1993, Griffin et Tauxe, 1991).

Dans les conditions réelles, la situation est plus complexe en raison de plusieurs facteurs. Premièrement, les agents pathogènes d'origine alimentaire sont toujours ingérés dans la nourriture, dont l'entrée dans l'estomac cause une augmentation

transitoire du pH, qui peut atteindre des pics de 6.2 à 6.6 après un repas standard comprenant de la viande, du pain, des patates et du lait, par exemple (Smith, 2003); le temps nécessaire pour le retour du pH à sa valeur au jeûne (< 2) varie selon l'âge entre 100 et 150 min (McLauchlan *et al.*, 1989; Smith, 2003). Ceci implique qu'il serait plus convenable de tenir compte des effets de la nourriture lors d'études ayant pour objectif de déterminer l'inactivation des agents pathogènes d'origine alimentaire par l'acidité gastrique. En fait, un effet remarquable de la nourriture sur la survie au transit gastrique a été mis en évidence par un modèle animal utilisant des rats Fisher (Drouault *et al.*, 1999) auxquels on a administré une suspension de *Lactobacillus lactis* (10^9 UFC/ml). Le taux de survie de la population bactérienne est passé de 7% (lorsque administrée en suspension) à 100% lorsque l'organisme a été mélangé à la nourriture de rat.

Deuxièmement, le temps de la vidange gastrique, qui est le temps de séjour de l'aliment dans l'estomac avant qu'ils soit évacué dans l'intestin, est influencé par la nature (solide ou liquide) et les caractéristiques (le taux du gras, la viscosité, etc.) de ce dernier (Smith, 2003). Selon le sexe et l'âge, ce temps varie entre 35 et 96 min pour les aliments liquides. Pour les aliments solides, la vidange débute 30 min après l'ingestion du repas et prend au total entre 104 à 182 min (McLauchlan *et al.*, 1989; Smith, 2003). Il en découle que l'intensité de la digestion gastrique varie en fonction du temps de séjour de l'agent pathogène dans l'estomac.

Le troisième fait à considérer est que les techniques de conservation des aliments imposent une combinaison de stress aux micro-organismes indésirables. Dans le cas

particulier de *E. coli* O157:H7 contaminant la mûlée crue de saucisses, les cellules auraient subi du stress acide et osmotique durant la fermentation et le sêchage, respectivement (théorie du stress combiné ou *hurdle effect*) (Leistner, 1994). Ces conditions sous-létales peuvent affecter la capacité de la bactérie à résister au stress additionnel rencontré dans le tractus digestif de l'homme résultant de l'acidité gastrique, de l'action des lysozymes salivaires, des enzymes protéolytiques (gastriques et intestinales) et des sels biliaires.

En vue de ce qui précède, et avec l'objectif d'évaluer de façon plus raffinée le risque associé à la consommation accidentelle de saucisses contaminées par *E. coli* O157:H7, une étude de digestion *in vitro* a été réalisée sous des conditions réalistes reflétant le transit dans le tractus digestif humain supérieur (article # 2). Les effets du stress sous-létal de la technique de conservation, de la matrice alimentaire, des sécrétions acides et enzymatiques et de la vidange gastrique ont été considérés.

Grâce à leur membrane externe qui masque la couche de muréine, les bactéries à Gram négatif sont constitutivement protégées contre l'action des lysozymes (Salyers et Whitt, 1994) qui agissent par hydrolyse du lien glycosidique entre l'acide N-acetylmuramique et N-acetylglucosamine de la couche glycopéptidique de la paroi cellulaire. Cependant, il a été récemment rapporté que l'acide lactique (5-10 mM) (Alakomi *et al.*, 2000), ainsi que d'autres agents physiques tels que la congélation-décongélation et la haute pression (Masschalck *et al.*, 2002), agissent par désintégration de la membrane externe et sensibilisent les bactéries à Gram négatif (y compris *E. coli* O157:H7) à l'action des lysozymes (10 µg/ml, 4 min). L'acide

lactique libéré par les ferments de maturation (homofermentaires) (article # 2) n'a pas sensibilisé les cellules de *E. coli* O157:H7 à l'action des lysozymes salivaires. Le temps de contact (1 min) et la concentration de lysozymes (0.1µg/ml) étaient probablement insuffisants pour générer une inactivation perceptible de la bactérie.

L'effet tampon immédiat de la matrice a été mis en évidence dans l'épreuve de digestion gastrique sous conditions statiques (sans ajustement du pH) (article # 2). Un fait intéressant de cette épreuve est la mise en évidence d'une interaction entre la matrice et la pepsine qui, grâce à la protéolyse et la libération d'acides aminés a causé une augmentation graduelle et modérée du pH. Dans le cas d'une toxi-infection due à la consommation de saucisses accidentellement contaminées, on s'attend d'après ce qui précède à ce que les cellules de *E. coli* O157:H7 soient exposées à des valeurs de pH entre 3.14 et 4.0 durant les premières phases de la digestion gastrique, valeurs auxquelles la bactérie était capable de survivre pour plusieurs jours dans la mayonnaise (Zhao et Doyle, 1994) et pour au moins 24 h dans du TSB acidifié (Miller et Kaspar, 1994).

L'augmentation du pH gastrique, causée par l'effet tampon des aliments, est physiologiquement compensée par une augmentation du débit des sécrétions acides. Une acidification graduelle du contenu gastrique (jusqu'au retour au pH 2) a été réalisée pour cette compensation (article # 2) de façon simultanée avec les transferts périodiques du contenu dans le compartiment intestinal (simulation de la vidange gastrique). La survie des cellules de *E. coli* O157:H7 était maintenue pour les premières fractions éliminées de la suspension gastrique, mais un début d'inactivation

a été observé pour les cellules exposées à des valeurs de $\text{pH} \leq 2.16$. Cette survie, qui est en accord avec des rapports précédents dans lesquels la résistance aux conditions acides a été vérifiée dans différents milieux de culture (Arnold et Kaspar, 1995; Benjamin et Datta, 1995; Miller et Kaspar, 1994), a été vraisemblablement assurée par le système de résistance glutamate-dépendant activé par l'acidification du milieu ($\text{pH} \sim 5.0$) durant la croissance des cellules dans le milieu TSBG. Cette épreuve a mis en évidence un rôle essentiel de la matrice alimentaire exploité par les cellules de *E. coli* O157:H7. Comme source riche en protéines (viande), la matrice a agi comme substrat pour l'action des enzymes protéolytiques (contenus dans la pancréatine) et la libération du glutamate, rendant possible la décarboxylation et la consommation subséquente de protons requis au maintien du pH intracytoplasmique à un niveau vital pour les cellules (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Foster, 2000). Ceci concorde bien avec des rapports précédents qui stipulent que les aliments riches en protéines (le bœuf haché, les œufs bouillis et le lait) protègent les bactéries entériques (Waterman et Small, 1998) et certaines bactéries lactiques (Charteris *et al.*, 1998) contre l'acidité gastrique.

La croissance était possible dans le suc pancréatique en raison des conditions optimales de pH. Cependant, cette croissance était fortement liée à l'intensité et la durée d'exposition antérieure à l'épreuve gastrique et, de ce fait, n'a pas été observée pour les populations préalablement exposées plus que 90 min (pH minimal 2.5). La croissance était précédée par une phase lag (typiquement de 120 min) pour permettre aux cellules la réparation des dommages causés durant l'épreuve gastrique.

La résistance à l'action détersive des extraits biliaries et à la dégradation par les protéases (contenues dans la pancréatine) revient à la nature sélective de la membrane externe, qui offre à la bactérie une barrière contre les agents externes néfastes (Salyers et Whitt, 1994). L'acquisition possible d'une couche superficielle de mucine (Charteris *et al.*, 1998) ou l'encloisement des cellules dans des gouttelettes de lipides (D'Aoust, 1985) peuvent aussi fournir une barrière additionnelle contre les activités enzymatiques.

Les sécrétions gastriques sont perçues depuis un siècle comme la première ligne de défense contre les agents pathogènes entériques. Cependant, il est clair, d'après ces résultats, que ces sécrétions n'offrent aucun défi sérieux à *E. coli* O157:H7. En fait, les populations ingérées résistent bien au transit gastrique, avant de retrouver des conditions favorables à leur croissance dans le compartiment intestinal. Sachant que la vidange complète du contenu gastrique se fait en moins de 2 h (Hunt et Spurrell, 1951), le temps d'exposition aux conditions adverses serait alors insuffisant pour inactiver complètement les populations du micro-organisme. Les observations et conclusions tirées de la présente étude jettent un peu de lumière sur la contribution de certains phénomènes physiologiques à la tolérance de *E. coli* O157:H7 au transit gastro-intestinal, qui est en parfait accord à la faible dose infectieuse rapportée pour l'organisme (10 to 100 cellules/g; Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1995). Du point de vue pratique, les procédés de fabrication de saucisses, ou tout autre procédure alimentaire, doivent être conçus de façon à ce qu'aucune cellule contaminante de *E. coli* O157:H7 ne peut survivre dans le produit final, destiné à la consommation sans traitement additionnel.

2. 3. Effets du stress du procédé de fermentation-séchage et de la digestion subséquente sur le pouvoir cytotoxique des cellules

Les toxines du type Shiga, sont des facteurs de virulence clés dans la pathogenèse de l'infection à *E. coli* O157:H7. Bien que la production de Stx soit constitutive dans les bouillons de culture, des variations du niveau de production en fonction de différentes combinaisons de stress sous-létaux et de la composition de la matrice alimentaire ont été rapportées dans la littérature.

Palumbo *et al.* (1995, 1997) ont testé l'effet de la présence d'une flore secondaire et de la température d'entreposage sur la production de Stx par des souches EHEC dans le lait et le bœuf haché. Ils ont démontré que le niveau de production est réduit à basses températures et en présence d'une forte concentration d'une flore secondaire, des conditions qui étaient également défavorables à la croissance de l'organisme. Un effet de la matrice alimentaire a été aussi mis en évidence, puisqu'une production réduite de Stx a été obtenue dans le lait en raison d'une présence possible d'inhibiteurs de nature peptidique (Palumbo *et al.*, 1997). Bucnic et Avery (1998) ont rapporté que la production subséquente de Stx dans des conditions optimales (tels que le gros intestin) augmente suite à une combinaison de stress comme la réfrigération sous conditions d'inanition suivie de chocs croisés thermique et acide. Par contre, Leenanon *et al.* (2003) ont montré que la combinaison de l'acidité et de l'inanition induit une augmentation de l'expression des gènes *stx*, mais n'affecte pas le niveau de production de la toxine mature.

La production de Stx par des cellules *E. coli* O157:H7 préalablement adaptées (croissance dans BHI à pH 5.6) ou non (croissance à pH 7.4) à l'acidité a été aussi évaluée suite à une simulation d'une fermentation et entreposage dans le BHI sous conditions de pH et de températures typiques d'un procédé de préparation de pepperoni (réduction progressive jusqu'à pH 4.8, correspondant aux pH final de pepperoni, suivi d'un entreposage pour 96 h à 15°C pour simuler le séchage). Une forte production qui restait stable a été obtenue par les cellules non adaptées, mais la production initialement faible par les cellules adaptées a augmenté durant l'entreposage.

Tout ce qui précède montre que, étant un facteur de virulence, l'expression et la production de Stx par les cellules de *E. coli* O157:H7 est affectée par la variété de stress appliquée par les procédés alimentaires, initialement conçus pour inactiver et empêcher la croissance des micro-organismes indésirables. Dans le cas particulier de saucisses fermentées séchées, les procédés de préparation exposent les agents pathogènes contaminants à une combinaison de stress (pH acide, faible a_w , présence de sel, de nitrates et de nitrites) en présence des ferments lactiques et de la flore normale des ingrédients. Après ingestion, les micro-organismes seront exposés à l'acidité gastrique avant d'atteindre le gros intestin et exercer leur virulence. Pour faire suite à l'étude d'évaluation du risque associé à la consommation de saucisses contaminées par *E. coli* O157:H7, on s'est intéressé à déterminer l'influence de l'ensemble de stress sous-létaux du procédé de fermentation-séchage et de la digestion subséquente des saucisses sur la production de Stx par la bactérie. Pour ce

faire, l'expression des gènes des toxines a été détectée par RT-PCR et la production de toxines actives a été déterminée par le test de toxicité sur les cellules Véro.

Il est bien connu que la détection des acides nucléiques par PCR ou RT-PCR dans les aliments s'est souvent heurtée à deux obstacles, soient l'abondance du gène ciblé et la présence d'inhibiteurs (Leenanon *et al.*, 2003; McIngvale *et al.*, 2002). Ces derniers peuvent agir par interférence avec la lyse cellulaire (nécessaire pour l'extraction de l'acide nucléique), dégradation ou séquestration de l'acide nucléique, et inactivation de la polymérase (Wilson, 1997). Ceci était le cas dans la présente étude (article # 3) où, en plus du faible nombre de cellules ciblées (ca. 10^4 UFC/ml), au moins quelques uns des composants de la matrice d'échantillons (les acides biliaires, les sels, les protéases, le Ca^{++} , la flore secondaire composée des ferments lactiques et de la flore de la viande, des composantes inconnues du bœuf, etc.) sont rapportés avoir une action inhibitrice sur l'amplification des acides nucléiques (Wilson, 1997). Les procédures d'enrichissement ne présentaient pas de solution pratique dans le présent cas, puisque la croissance des populations ou le changement environnemental peuvent affecter les résultats. En incluant une étape de pré-centrifugation, il a été possible de concentrer les cellules et de réduire les inhibiteurs, sans recours aux procédures d'enrichissement.

Le fait que des produits d'amplification pour *stx-I* et *stx-II* soient détectés dans tous les échantillons de saucisses contaminées montre que la multitude de stress, appliquée par la procédure de fermentation séchage et/ou la digestion gastrique, n'a pas inhibé l'expression des gènes des deux toxines par *E. coli* O157:H7. L'absence des bandes

dans les saucisses non contaminées et dans les réactions de PCR confirme la spécificité des bandes générées par RT-PCR et exclue les possibilités de contamination ou d'amplification de co-extraits d'ADN.

Le test de cytotoxicité sur les cellules Véro a été utilisé comme méthode standard de détection des Stx. Conformément à la littérature (Palumbo *et al.*, 1995), la quantité de toxines détectée dans les filtrats de cultures de veille (contrôles positifs) était reliée à la concentration bactérienne (article # 3). Cependant, la procédure de fermentation-séchage a causé une augmentation du niveau de toxines. Ceci peut être expliqué par la régulation des gènes *stx* par la variété de stress chimique ou physiques de la procédure (présence de sel, de nitrates et de nitrites, faible pH et a_w , changement de température, etc.) qui ont résulté en une inactivation incomplète et causé des lésions sous létales aux cellules du micro-organisme.

L'effet des stress sous létaux individuels ou combinés sur l'expression subséquente de la virulence des pathogènes a été rapporté dans la littérature (Bucnic et Avery, 1998; Rees *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2000). En effet, Bucnic et Avery (1998) ont rapporté que la productivité de Stx par *E. coli* O157:H7 est régulée via des mécanismes cellulaires multiples et complexes impliquant la basse température, l'inanition, les chocs acide et thermique, et les réactions déclenchées par le changement brusque de la température.

L'augmentation d'intensité de l'épreuve gastrique a résulté en une augmentation du niveau de Stx dans les filtrats de saucisses digérées, coïncidant avec une réduction en

nombre de *E. coli* O157:H7 (article # 3). Bien que titres similaires ont été obtenus, la co-incubation en présence de filtrats de saucisses exposées à la digestion maximale a résulté en une destruction de plus de 90% de la monocouche de cellules Véro, comparée à ca. 50% pour les filtrats de la digestion minimale. L'augmentation peut résulter en partie d'une libération de toxines pré synthétisées suite à la mort cellulaire et la lyse membranaire (Kanbar *et al.*, 2003). En effet, une destruction partielle a été observée chez les populations du micro-organisme relâchées dans le suc pancréatique avec les dernières fractions du contenu gastrique (section précédente). Une autre manière par laquelle l'acidité peut causer une augmentation du niveau de Stx est via l'induction d'une réponse SOS dans la bactérie. L'acidité induit des dommages à l'ADN bactérien, principalement par dépurination. L'ADN endommagé interagit et active la protéine multifonctionnelle RecA qui, à son tour, cause la dégradation des répresseurs LexA et CI (Choi *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000). La dé-repression des gènes régulés par LexA mène à un arrêt temporaire de synthèse de l'ADN et de division cellulaire, et à une augmentation de l'expression des gènes régulés par SOS en vue de la réparation des dommages (Choi *et al.*, 2000; Kimmitt *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000). Parallèlement, le clivage de la protéine CI répresseur/activateur du cycle lytique des phages lambdaïdes induit l'expression des gènes des bactériophages intégrés portant *stx-I* et *stx-II*. La réponse SOS est aussi suivie d'une lyse cellulaire et d'un relâchement des toxines (Kanbar *et al.*, 2003; Kimmitt *et al.*, 2000).

Si les facteurs de risque de progression de la colite hémorragique au SHU incluent principalement la production de Stx, la présente étude soulèvera alors le même genre

de questionnement que celui entourant l'usage des agents antimicrobiens: l'inactivation des cellules de *E. coli* O157:H7 par les techniques de préservation accentue-t-elle la gravité de l'infection? L'acidité gastrique, longtemps perçue comme barrière à la survie des micro-organismes ingérés, augmente-t-elle l'expression de la virulence par ces derniers? Les données de l'étude doivent être considérées dans les planifications futures de procédures expérimentales de validation, qui deviennent un moyen de plus en plus utilisé pour assurer la production d'aliments sécuritaires.

5. CONCLUSIONS

Les données recueillies et leur analyse ont permis, de façon générale, d'atteindre les objectifs visés, soit l'étude de l'influence de la préparation de l'inoculum, de la procédure d'inoculation et de paramètres sélectionnés du procédé sur la survie de *E. coli* O157:H7 durant la préparation de saucisses fermentées séchées; étude de l'effet du stress imposé par le procédé de fermentation-séchage sur la survie des cellules de *E. coli* O157:H7 durant un processus de digestion *in vitro*, simulant de près le transit gastro-intestinal humain; étude du potentiel cytotoxique et de l'expression des gènes *stx* par des cellules de *E. coli* O157:H7 préalablement stressées par le procédé de fermentation-séchage et la digestion subséquente. Les nouvelles connaissances générées ont permis de rajouter certaines informations manquantes pouvant être utiles lors d'études futures de validation de procédés. De plus, en raison de la gravité de l'infection et de l'absence de modèle animal convenable, les études *in vitro* de digestion et d'évaluation du pouvoir cytotoxique des cellules de l'agent pathogène ont permis une évaluation du risque, en cas de toxi-infection par consommation de saucisses contaminés. De façon particulière, voici les conclusions les plus significatives qui ont été tirées de cette étude:

1. L'analyse critique de la méthode officielle de validation a démontré que la croissance en présence de glucose ne maximise pas la résistance des cellules de *E. coli* O157:H à l'acidité et que le choix de la procédure d'inoculation peut affecter les résultats, lors d'une étude de validation de procédés.

2. La survie de *E. coli* O157:H durant le procédé de fermentation-séchage est une caractéristique commune parmi plusieurs souches et n'est pas restreinte aux isolats de saucisse.
3. Le séchage extensif (a_w 0.79) suivant la fermentation et la garde à 37°C peut livrer les $5\log_{10}$ de destruction requis par FSIS et ACIA, mais l'applicabilité de ces traitements est restreinte à certains produits occupant une petite part du marché des produits fermentés séchés.
4. La barrière gastrique ne réduit pas le risque associé à la consommation de saucisses contaminées par *E. coli* O157:H7; la présence et la nature de la matrice alimentaire ainsi que la durée de la vidange gastrique peuvent influencer la survie du micro-organisme durant le transit gastrique, et les populations survivantes peuvent se multiplier à nouveau dans l'intestin.
5. L'inactivation incomplète des populations de *E. coli* O157:H7 par les procédés alimentaires génère des dommages sous-létaux qui régulent la virulence des cellules du micro-organisme, se traduisant par une augmentation de la productivité de toxines.
6. Les dommages causés à l'ADN par l'acidité gastrique peuvent déclencher une réponse SOS chez *E. coli* O157:H7, qui résulte en une augmentation du pouvoir cytotoxique de la bactérie par régulation de l'expression des gènes des

bactériophages intégrés portant *stx-I* et *stx-II* et/ou la mort cellulaire et le relâchement de toxines préformées.

Les 5 log₁₀ de réduction de la population de *E. coli* O157:H7 ont pu être atteints dans la présente étude, mais l'utilité des données est restreinte à certains produits qui tolèrent un séchage extensif sans détérioration des qualités organoleptiques. Le stress des procédés de traitement des aliments conçus pour réduire la charge microbienne peut générer des micro-organismes contaminants plus virulents. Le transit gastro-intestinal n'offre pas de protection additionnelle contre les cellules de *E. coli* O157:H7 ingérées dans la nourriture, mais risque d'augmenter l'expression des gènes de virulence par ces derniers.

6. BIBLIOGRAPHIE

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

Ahmed, R., C. Bopp, A. Borczyk, and S. Kasatiya. 1987. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 155: 806-809.

Alakomi, H. L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva, and L. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 2001-2005.

Anonymous. 1993. Report on the *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in the western states. Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Anonymous. 1997. Santé Canada, relevé des maladies transmissibles au Canada – volume 23-5, 1 mars 1997. Éclosions d'infections à *Escherichia coli* O157:H7 et de cryptosporidioses liées à la consommation de cidre non pasteurisé - Connecticut et État de New York. octobre 1996.

Anonymous. 1998. Dynabeads® anti-*E.coli* O157 for rapid selective enrichment of *Escherichia coli* O157. Disponible au <http://www.dynal.frame@wanadoo.fr>

Anonymous, 1999. PG Index. Hemolytic uremic syndrome (HUS). Disponible au <http://www3.bc.sympatico.ca/me/patientsguide/huspg.htm>

Anonymous, 2000. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with contaminated municipal water supply, Walkertown, Ontario, May-June 2000. Canada Communicable Disease Report. Volume 26-20, 15 octobre 2000.

Anonymous, 2001. *Escherichia coli* entérohemorragique (EHEC). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Disponible au http://213.56.69.149/ftp/fiches/mic/ecoli/fiche-E.coli_08.11.01-pdf.

Anonymous. 17 July 2002-a. News release. U of G researchers testing *Escherichia coli* O157:H7 vaccine for cattle. Disponible au <http://www.uguelph.ca/mediarel/archives/001688.html>.

Anonymous. 2002-b. Experimental vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 proved safe and effective in preliminary trials. National Institute of Child Health and Human Development. Disponible au <http://www3.bcsympatico.ca/me/patientsguide/ecolvacc.htm>.

Archer, D. L. 1996. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. Trends Food Sci. Technol. 7: 91-95.

Armstrong, G. D., E. Fodor, and R. Vanmaele. 1991. Investigation of Shiga-like toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. *J. Infect. Dis.* 164 : 1160-1167.

Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, and J. G. Morris, Jr. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18: 29-51.

Arnold, K. W., and C. W. Kaspar. 1995. Starvation and stationary-phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 2037-2039.

Bacus, J. 1984. Utilization of Microorganisms in Meat Processing. Research Studies Press Ltd., Letchworth, UK.

Bauer, M. E., and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 64: 167-175.

Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffin, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr, C. A. Bartleson, J. H. Lewis, T. J. Barrett, J. G. Wells, R. Baron, and J. Kobayashi. 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 1349-1353.

Benjamin, M. M., and A. R. Datta. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 1669-1672.

Besser, R. E., S. M., Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.* 269: 2217-2221.

Beutin, L., U. H. Stroehel, and P. A. Manning. 1993. Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene.* 132: 95-99.

Beutin, L., S. Zimmermann, and K. Gleier. 1996. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.* 34:2812-2814.

Böhm, H., and H. Karch. 1992. Fingerprinting of strains by pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2169-2172.

Bruner, W., H. Schmidt, and H. Karch. 1996. KatP, a novel catalase-peroxydase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol.* 142: 3305-3315.

Buchanan, R. L., and S. G. Edelson. 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 4009-4013.

Bucnic, S., and S. M. Avery. 1998. Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 15: 319-328.

Butterton, J. R., and S. B. Calderwood. 1996. Live, oral attenuated vaccine vectors for prevention of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, pp 425-433. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takedo, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62: 118-119.

Calicioglu, M., N. G. Faith, D. R. Buege, and J. B. Luchanski. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature cooked beef summer sausage. *J. Food Prot.* 60: 1158-1162.

Calicioglu, M., N. G. Faith, D. R. Buege, and J. B. Luchanski. 2001. Validation of a manufacturing process for fermented, semidry Turkish soudjouk to control *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 64: 1156-1161.

Carter, A. O., A. A. Borczyk, J. A. K. Carlson, B. Harvey, J. C. Hockin, M. A. Karmali, C. Krishnan, D. A. Korn, and H. Lior. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in nursing home. *N. Engl. J. Med.* 317: 1496-1500.

Castanie-Cornet, M-P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and W. Foster. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 3525-3235.

Centers for Disease Control. 1993. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 42: 258-263.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995-a. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44: 157-160.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995-b. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* O104:H21-Helena' Montana, 1994. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 44: 501-503.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995-c. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O11:NM-south Australia, 1995. *Morbid. Mortal. Wkly Rep.* 44: 550-558.

Chang, Y. Y., and J. E. Cronan. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33: 249-259.

Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.

Cheville, A. M., K. W., Arnold, C. Buchrieser, C. M. Cheng, and C. W. Kaspar. 1996. *RpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 1822-1824.

Chikthimmah, N., R. C. Anantheswaran, R. F. Fobert, E. W. Mills, and S. J. Knabel. 2001. Influence of sodium chloride on growth of lactic acid bacteria and subsequent destruction of *Escherichia coli* O157:H7 during processing of Lebanon bologna. *J. Food Prot.* 64: 1145-1150.

Choi, S. H., D. J. Baumler, and C. W. Kaspar. 2000. Contribution of *dps* acid stress tolerance and oxydative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 3911-3916.

Cimolai, N., J. E. Carter, B. J. Morrison, and J. D. Anderson. 1990. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J. Pediatr.* 116: 589-592.

Cimolai, N., S. Basalyga, D. G. Mah, B. J. Morrison, and J. E. Carter. 1994. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin. Nephrol.* 42:85-89.

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

Cordovez, A., V. Prado, L. Maggi, J. Cordero, J. Martinez, A. Misraji, R. Rios, G. Soza, A. Ojeda, and M. M. Levine. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2153-2157.

Cornelius, C., C. Lentren and A. Wink eds. 1981. Geigy Scientific Tables. Units of measurement. Body fluids, composition of the body. Nutrition, Volume 1. ISBN, USA.

Cornick, N. A., S. L. Booher, T. A. Casey, and H. W. Moon. 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl. Env. Microbiol.* 66 : 4926-4934.

Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 429-453.

Cui, S., J. Meng, and A. A. Bhagwat. 2001. Availability of glutamate and arginine during acid challenge determines cell density-dependent survival phenotype of *Escherichia coli* strains. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 4914-4918.

Dabin, E., and R. Jussiaux. 1994. Le saucisson sec. ERTI, paris.

D'Aoust, J. Y. 1985. Infective dose of *Salmonella* Typhimurium in cheddar cheese. *Am. J. Epidemiol.* 122: 717-719.

Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, W. C. Cray, Jr., and H. W. Moon. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.* 65: 1842-1848.

Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, and A. D. O'Brien. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect. Immun.* 66: 4560-4563.

deGrandis, S., H. Laws, J. Brunton, C. Gyles, and C. A. Lingwood. 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J. Biol. Chem.* 264: 12520-12525.

Delazari, I., S. T. Iara, H. P. Riemann, D. O. Cliver, and T. Mori. 1998. Decontaminating beef for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 61: 547-550.

De Vinney, R., M. Stein, D. Reinscheid, A. Abe, S. Ruschkowski, and B. Lay 1999. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but not tyrosine phosphorylated. *Infect. Immun.* 67: 2389-2398.

Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy, and J. B. Kaper. 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J. Clin. Invest.*

Dorak, M. T. 2003. Real-time PCR. Disponible au: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>

Doyle, M. P., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In *Food Microbiology – Fundamental and Frontiers*, M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.). ASM Press, Washington, D. C.

Drouault, S., G. Corthier, S. D. Ehrlich, and P. Renault. 1999. Survival, physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 4881-4886.

Duffy, L. L., F. H. Grau, and P. B. Vanderline. 2000. Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with foodborne disease and meat. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 83-89.

Easton, L. 1997. *Escherichia coli* O157:H7: occurrence, transmission and laboratory detection. *Br. J. Biomed. Sci.* 54: 57-64.

Ellajosyula, K. R., S. Doores, E. W. Mills, R. A. Wilson, R. C. Anantheswaran, and S. J. Knabel. 1998. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in lebanon bologna by interaction of fermentation pH, heating temperature, and time. *J. Food Prot.* 61: 152-157.

Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, Y. Ogasawara, and K. Igarashi. 1988. Site of action of Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 171: 45-50.

Epley, R. J., P. B. Addis, J. J. Warthesen. 1992. Nitrite in Meat. Disponible au <http://www.extension.umn.edu/distribution/nutrition/DJ0974.html>.

- Faith, N. G., J. A. Shere, R. Brosch, K. W. Arnold, S. E. Ansay, M. S. Lee, J. B. Luchansky, and C. W. Kaspar. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 1519-1525.
- Faith, N. G., N. Parniere, T. Larson, T. D. Lorang, and J. B. Luchansky. 1997. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and -20°C under air, vacuum and CO₂. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 47-54.
- Faith, N. G., N. Parniere, T. Larson, T. D. Lorang, T. D. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1998-a. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in salami following conditioning of batter, fermentation and drying of sticks, and storage of slices. *J. Food Prot.* 61: 377-382.
- Faith, N. G., R. K. Wierzba, A. M. Ihnot, A. M. Roering, T. D. Lorang, C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1998-b. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in full-and reduced-fat pepperoni after manufacture of sticks, storage of slices at 4°C or 21°C under air and vacuum, and baking of slices of frozen pizza at 135, 191 and 246°C. *J. Food Prot.* 61: 383-389.
- Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C., USA. EID, volume 1, April-June 1995.

Foster, J. W. 2000. Microbial responses to acid stress, p. 99-115. *In* G. Storz (ed.), bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.

Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30: 911-921.

Frost, J. A., H. R. Smith, G. A. Willshaw, S. M. Scotland, R. J. Gross, and B. Rowe. 1989. Phage-typing of vero-cytotoxin (VT) producing *Escherichia coli* isolated in the United Kingdom. *Epidemiol. Infect.* 103: 73-81.

Frost, J. A., T. Cheasty, A. Thomas, and B. Rowe. 1993. Phage-typing of vero-cytotoxin (VT) producing *Escherichia coli* isolated in the United Kingdom: 1989-1991. *Epidemiol. Infect.* 110: 469-475.

García-Graells, C., B. Masschalck, and C. W. Michiels. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Prot.* 62: 1248-1254.

Gauthier, S. F., C. Vachon, and L. Savoie. 1986. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *J. Food Sci.* 51: 960-964.

Getty, K. J. K., R. K. Phebus, J. L. Mardsen, D. Y. C. Fung, and C. L. Kastner. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiol.* 8: 141-170.

Getty, K. J. K., R. K. Phebus, J. L. Mardsen, J. R. Schwenke, and C. L. Kastner. 1999. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in large (115 mm), and intermediate (90 mm) diameter Lebanon-style bologna. *J. Food Sci.* 64: 1100-1107.

Giannella, R. A., S. A. Broitman, and N. Zamcheck. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut.* 13: 251-257.

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

Gorden, J., and P. L. C. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61: 364-367.

Griffin, P. M. 1998. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States, pp 15-22. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

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: 60-97.

Habib, N. F., and M. P. Jackson. 1993. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. *J. Bacteriol.* 175:597-603.

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:H7 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35: 11-19.

Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, D. E. Herriott, and P. I. Tarr. 1997. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in fourteen cattle herds. *Epidemiol. Infect.* 118: 193-195.

Hauben, K. E. Wuytack, C. Soontjens, and C. W. Michiels. 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J. Food Prot.* 59: 350-355.

Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn, and J. L. Slonczewski. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 3978-3981.

Hinkens, J. C., N. G. Faith, T. D. Lorang, P. Bailey, D. Buege, C. W. Kaspar, and J. B. Luchanski. 1996. Validation of pepperoni process for control of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 59: 1260-1266.

Honish, A. 1986. Summary of *Escherichia coli* O157:H7 at an Edmonton extended care facility. *Alberta Society Services Community Health.* 10:363-368.

Hueck, C. J. 1998. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.

Hunt, B. J. N., and W. R. Spurrell. 1951. The pattern of emptying the human stomach. *J. Physiol.* 113: 157-168.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1980. *Microbial Ecology of Foods*, vol. 1: Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press, New York.

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

Jordan, K. N., L. Oxford, and C. P. O'Byrne. 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alteration in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 3048-3055.

Junkins, A. D., and M. P. Doyle. 1989. Comparison of adherence properties of *Escherichia coli* O157:H7 and a 60-megadalton plasmid-cured derivative. *Curr. Microbiol.* 19: 21-27.

Kanbar, A., Rahal, E., and Matar, G. M. 2003. *In vitro* inhibition of the expression of *Escherichia coli* O157:H7 genes encoding the Shiga like toxins by antimicrobial agents: potential use in the treatment of human infections. *J. Appl. Res.* 2003. Disponible au <http://www.jrnlappliedresearch.com/articles/Vol3Iss2/Matar.htm>

Kaper, J. B., and A. D. O'Brien (ed). 1998. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.

Kaper, J. B., L. J. Gansheroff, M. R. Wachtel, and A. D. O'Brien. 1998-a. Intimin-mediated adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens, pp 148-156. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Kaper, J. B., S. J. Elliott, V. Sperandio, N. T. Perna, G. F. Mayhew, and F. R. Blattner. 1998-b. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement, pp: 163-182. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Karch, H., C. Jetzki-Mittman, S. Aleksic, and M. Datz. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture. *J. Clin. Microbiol.* 34: 516-519.

Karch, H., H. Schmidt, and W. Brunder. 1998. Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7, pp. 183-194. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Karch, H., J. Heesemann, R. L. Aufs, A. D. O'Brien, C. O. Tacket, and M. M. Levine. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* 55: 455-461.

Karch, H., and T. Myer. 1989. Evaluation of oligonucleotides probes for identification of Shiga-like-toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1180-1186.

Keene, W. E., J. M. McAnulty, F. C. Hosely, P. Williams, K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. Swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331: 579-584.

Keene, W. E., E. Sazie, J. Kok, D. H. Rice, D. D. Hancock, V. K. Balan, T. Zhao, and M. P. Doyle. 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *J. Am. Med. Assoc.* 277: 1229-1231.

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

Kerr, K. G. 1999. Infections associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli*: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Infect. Dis. Rev.* 1: 9-14.

Khakhria, R., D. Duck, and H. Lior. 1990. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* 105: 511-520.

Kimmit, P. T., C. R. Harwood, and M. R. Barer. 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 458-465.

Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 1290-1298.

Kofoth, C., W. R. Edel, and M. Gareis. 1998. Beeinflussung des Überlebens von enterohemorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Rohwurstprodukten. *Mitteilungsblatt der BAFV*. 140:153-159.

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

Krause, U., F. M. Thomson-Carter, and T. H. Pennington. 1996. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J. Clin. Microbiol.* 34: 959-961.

Kresse, A. U., K. Schulze, C. Deibel, F. Ebel, M. Rohde, T. Chakraborty, and C. A. Guzman. 1998. Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 4370-4379.

Kudva, I. T., P. G. Hatfield, and C. J. Hodve. 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 34: 431-433

Leenanon, B., D. Elhanafi, and M. A. Drake. 2003. Acid adaptation and starvation effects on Shiga toxin production by *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 66: 970-977.

Leistner, L. 1994. Stable and safe fermented sausages world-wide. *In " Fermented Meats"* (G. Campbell-Platt et P. E. Cook, eds), PP 160-175. Blackie Academic and Professional, New York.

Leyer, G. J., L. L. Wang, and E. A. Johnson. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 3752-3755.

Lin, J., Lee, I. S., J. Frey, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4097-4104.

Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Maik, G. N. Bennett, and J. W. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 3094-3100.

Lopez, E., M. M. Contrini, S. Devoto, M. F. Derosa, M. G. Grana, L. Aversa, H. F. Gomez, M. H. Genero, and T. G. Cleary. 1995. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J. Pediatr.* 127: 364-367.

MacDonald, D., M. Fyfe, A. Paccagnella, J. Fung, J. Harb, and K. Louie. 2001. Écllosion d'infection à *Escherichia coli* O157:H7 liée à du salami, Colombie-Britannique, Canada, 1999. Disponible au http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/fetp-pfei/abs01_f.html.

Mann, E. 1994. Méthode de détection d'*Escherichia coli* producteur de vérocytotoxine dans des échantillons de viandes crues ou cuites. Manuel des méthodes, salubrité des aliments version 2.0, novembre 1994.

Masschalck, B., D. Deckers, and C. Michiels. 2002. Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of Gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 65: 1916-1923.

McCleery, D. R., and M. T. Rowe. 1995. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. *Letters in Appl. Microbiol.* 21: 252-256.

McDaniels, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 1664-1668.

McIngvale, S. C., E. Elhanafi, and M. A. Drake. 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 779-806.

McKee, M. L., A. R. Melton-Celsa, R. A. Moxley, D. H. Francis, and A. D. O'Brien. 1995. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to Hep-2 cells. *Infect. Immun.* 63: 3739-3744.

McLauchlan, G., G. M. Fullarton, G. P. Crean, and K. E. McColl. 1989. Comparison of gastric body and antral pH: a 24 hour ambulatory study in healthy volunteers. *Gut*. 30: 573-578.

Meng, J., and M. P. Doyle. 1998. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, pp 92-108. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* Strains. ASM Press, Washington D. C.

Melton-Celsa, A. R., and A. D. O'Brien. 1996. Activation of Shiga-like toxins by moose and human mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 64: 1569-1576.

Michino, H., K. Araki, S. Minami, T. Nakayama, Y. Ejima, K. Hiroe, H. Tanaka, N. Fujita, S. Usami, M. Yonekawa, K. Sadamoto, S. Takaya, and N. Sakai. 1998. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. ASM Press, Washington, D.C.

Milford, D. V. 1992. HUS in the UK, pp 39-59. In B. S. Kaplan, R. S. Trompeter, and J. L. Moake (ed), hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Marcel Decker, Inc., New York, N. Y.

Miller, L. G., and C. W. Kaspar. 1994. *Escherichia coli* O157:H7. Acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57: 460-464.

Molly, K., M. V. Woestyne, I. De Smet, and W. Verstraete. 1994. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganisms-associated activities. *Microbial Ecology in Health Disease.* 7: 191-200.

Morgan, D., C. P. Newman, D. N. Hutchinson, A. M. Walker, B. Rowe, and F. Masid. 1993. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111: 181-187.

Moxley, R. A., and D. H. Francis. 1998. Overview of animal models, pp 249-260. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Mukherjee, J., C. Kerry, D. Fishwild, D. Hudson, S. O'Donnell, S. M. Rich, A. Donohue-Rolfe, and S. Tzipori. 2002. Production and characterization of protective human antibodies against Shiga toxin. *Infect. Immun.* 70: 5896-5899.

Naim, F., S. Messier, L. Saucier, and G. Piette. 2003. A model study of *Escherichia coli* O157: H7 survival in fermented dry sausages - Influence of inoculum preparation, inoculation procedure and selected process parameters. *J. Food Prot.* 66 (12): 2267-2275.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201.

Nickelson, R. II, C. W. Kaspar, E. A. Johnson, and J. B. Luchansky. 1996. Update on dry fermented sausage and *Escherichia coli* O157:H7 validation research. University of Wisconsin_Madison. Research report no. 11-316. National Cattlemen's Beef Association, Chicago, IL.

Nissen, H., and A. Holk. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. Food Microbiol. 15: 273-279.

Notermans, A., P. in't Veld, T. Wijtzes, and G. C. Mead. 1993. A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. Food Microbiol. 10:145-157.

O'Brien, A. D., and G. D. La Veck. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40:675-683.

O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:694-696.

Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and C. P. Lattuada. 1990. A research note: use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* 53: 941-943.

Ostroff, S. M., J. M. Kobayashi, and J. H. Lewis. 1989-a. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State; the first year of statewide disease surveillance. *J. Am. Med. Assoc.* 262: 355-359.

Padhye, N. V., and M. P. Doyle. 1992. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J. Food Prot.* 55: 555-565.

Palumbo, S. A., A. Pickard, and J. E. Call. 1997. Population changes and verotoxin production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains inoculated in milk and ground beef held at low temperatures. *J. Food Prot.* 60: 746-750.

Palumbo, S. A., J. E. Call, F. J. Schultz, and A. C. Williams. 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 58: 352-356.

Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998-a. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb_{O111}*, *rfb_{O157}*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 598-602.

Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998-b. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11: 450-479.

Piérard, D., D. Stevens, L. Moriau, H. Lior, and S. Lauwers. 1997. Isolation and virulence factors of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. Clin. Microbiol. Infect. 3: 531-540.

Poitras, E., and Houde, A. 2002. La PCR en temps réel: Rev. Biol. Biotech. By The Moroccan Society of Biology in Canada. 2: 2-11. principes et applications. Disponible au : <http://www.rbmc.qc.ca/Reviews/Poitras.htm>.

Popoff, M. R. 1998. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. Toxicol. 36: 665-685.

Powell, D. A. 16 November 1999. Fleetwood Sausage Company extends investigation of confirmed contamination *E. coli* scare prompts salami recall. Disponible au: fsnet-1@listserv.uoguelph.ca. Accessed 17 January 2000.

Pozzi, W., L. Beutin, and H. Weber. 1996. überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst. Fleischwirtschaft. 76:1300-1311.

Price, S. B., C. M. Cheng, C. W. Kaspar, J. C. Wright, F. J. DeGraves, T. A. Penfound, P. P. Castanie-Cornet, and J. W. Foster. 2000. Role of *rpoS* in acid

resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 632-637.

Raghubeer, E. V., and D. J. R. Matches, 1990. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *Escherichia coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* 28: 803-805.

Ralph, A., and M. D. Giannella. Accédé le 12 janvier 2003. Enterohemorrhagic *E. coli* and hemorrhagic colitis: an important food-borne pathogen. Disponible au <http://www.sapd.org/pdf/cm.pdf>.

Read, S. C., R. C. Clarke, A. Martin, S. A. De Grandis, J. Hii, S. McEwen, and C. L. Gyles. 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol. Cell. Probes.* 6: 153-161.

Reed, C. A. 1995. Challenge study - *Escherichia coli* O157:H7 in fermented sausage. Letter to Plant managers; April 28, 1995. USDA, FSIS, Washington, D. C.

Rees, C. E. D., C. E. R. Dodd, P. T. Gibson, I. R. Booth, and G. S. A. B. Stewart. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 263-275.

Reitmeyer, M. 1996. Clinical Medical Conference, 23 octobre, 1996. Hemorrhagic *Escherichia coli*. Disponible au <http://hscovirginia.edu/medicine/internal/conf/chiefs/ecoli.htm>.

Rice, D. D. Hancock, and T. E. Besser. 1995. Verotoxigenic *E. coli* O157:H7 colonization of wild deer and range cattle. *Vet. Rec.* 137: 254 (letter).

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, H. M. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.

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

Riordan, D. C. R., G. Duffy, J. J. Sherudan, B. S. Eblen, R. C. Whiting, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 2000. Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 1726-1729.

Robins-Browne, R. M., Elliott, E., and Desmarchelier, P. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia In J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (ed.).

Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Rocelle, M., S. Clavero, and L. R. Beuchat 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 3268-3273.

Rogers, J. R. 4 août 2000. FDA warning letter (press release). Disponible au : <http://www.pharmcast.com/WarningLetters/September2000/Synsorb900.htm>.

Rowbury, R. J., and M. Goodson, 1998. Glucose-induced acid tolerance appearing at neutral pH in log-phase *Escherichia coli* and its reversal by cyclic AMP. *J. Appl. Microbiol.* 85: 615-620.

Samadpour, M., L. M. Grimm, B. Desai, A. Dalia, J. E. Ongerth, and P. Tarr. 1993. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 strains by bacteriophage restriction fragment length polymorphisms analysis: application to a multistate foodborne outbreak and a day-care centre cluster. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3179-3183.

Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 1994. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. ASM Press, Washington D. C.

Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan. 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect. Immun.* 58: 611-618.

Sandvig, K., and B. Van Deurs. 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76:949-966.

Santé Canada. 2000. Lignes directrices provisoires sur le contrôle d'*Escherichia coli* vérotoxino-gène y compris *E. coli* O157:H7 dans le saucisson fermenté et prêt à manger contenant du bœuf ou des produits de bœuf comme ingrédients. Ligne directrice n° 12 publiée par la Direction des aliments. Direction générale de la protection de la santé. 24 février 2000. disponible au : http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhedme/rfaoaoca/f_ligne_directrice_pour_le_saucisson_fermente.html.

Savoie, L. 1993. Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of *in vitro* models. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 72:407-414

Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63: 1055-1061.

Schmidt, H., H. Karch, and L. Beutin. 1994. The large-sized plasmids of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are

presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. FEMS Microbiol. Lett. 117: 189-196.

Schmidt, H., C. Kernbach, and H. Karch. 1996. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology. 142: 907-914.

Schmitt, C. K., K. C. Meysick, and A. D. O'Brien. 1999. Bacterial toxins: friends or foes?. Emerg. Infect. Dis. 5: 224-234.

Schroeder, C. M., C. Zhao, C. DebRoy, J. Torcolini, S. Zhao, D. G. White, D. D. Wagner, P. F. McDermott, R. D. Walker, and J. Meng. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from human, cattle, swine, and food. Appl. Env. Microbiol. 68: 576-581.

Scotland, S. M., B. Rowe, H. R. Smith, G. A. Willshaw, and R. J. Gross. 1998. Verocytotoxin producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uremic syndrome and their detection by specific DNA probes. J. Med. Microbiol. 25: 237-243.

Sears, C. L., and J. B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretions. Microbiol. Rev. 60: 167-215.

Sharma, V. K. 2002. Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65: 1371-1380.

Shi, X., and G. N. Bennett. 1994. Effects of *rpoA* and *cysB* mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 7017-7023.

Siegele, D. A., and R. Kolter. 1992. Life after log. *J. Bacteriol.* 174: 345-348.

Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, and J. L. Slonczewski. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* 176: 1729-1737.

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.

Smith, H. R., G. A. Willshaw, T. Cheasty. Accédé le 18 septembre 2002. Typing of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* for epidemiological investigations.

Société Canadienne de Pédiatrie, Comité des maladies infectieuses et d'immunisation. 2002. L'*Escherichia coli* O157:H7, les autres colibacilles vérotoxigènes et le syndrome hémolytique et urémique chez l'enfant. Disponible au <http://www.cps.ca/français/enonces/ID/id95-03.htm>.

Söderholm, K. J. M. R. Mukherjee, and J. Longmate. 1996. Filter leachability of composites stored in distilled water or artificial saliva. *J. Dental. Res.* 75: 1692-1699.

Stiebing, A., J. Baumgart, and N. Vogt. 1998. EHEC - Überlebensfähigkeit in schnittfester und streichfähiger Rohwurst. *Mitteilungsblatt der BAFF.* 140:160-167.

Stim, K. P., and G. N. Bennett. 1993. Nucleotide sequence of the *adi* gene which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:1221-1234.

Stroeder, U. H., L. Bode, L. Beutin, and P. A. Manning. 1993. Characterization and sequence of a 33-kDa enterohemolysin (Ehly1)-associated protein in *Escherichia coli*. *Gene.* 132: 89-94.

Takeda, T., S. Dohi, I. Igerashi, T. Yamanaka, K. Yoshiya, and N. Kabashi. 1993. Impairment by verotoxin of tubular function contributes to the renal damage seen in hemolytic, uremic syndrome. *J. Infect.* 27: 339-341.

Tesh, V. L., J. A. Burris, J. W. Owens, V. M. Gordon, E. A. Wadolkowski, A. D. O'Brien, and J. E. Samuel. 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and II for mice. *Infect. Immun.* 61: 3392-3402.

Thayer, D. W., and G. Boyd. 1993. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1030-1034.

Thomson, P. D. 1992. HUS in Johannesburg South Africa, pp 79-88. *in* B. S. Kaplan, R. S. Trompeter, and J. L. Moake (ed.), Hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Marcel Decker, Inc. New York, N. Y.

Thompson, J. S., D. S. Holdge, and A. A. Borczyk. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2165-2168.

Tilden, J. Jr., W. Young, A. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S.B. Werner, J. Hollingsworth, and J. G. Morris. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Publ. Hlth.* 86:1142-1145.

Todar, K. 1997. University of Wisconsin Department of Bacteriology. Bacteriology 330 lecture topics: pathogenesis *E. coli*. Disponible au <http://bact.wisc.edu/bact330> 330lecturetopics.

Todd, E. C. D., R. A. Szabo, J. M. MacKenzie, A. Martin, K. Rahn, C. Gyles, A. Gao, D. Alves, and J. Yee. 1999. Application of s DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 4775-4780.

Tomicka, A., J. Chen, S. Barbut, and M. W. Griffiths. 1997. Survival of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 in a model system representing fermented sausage production. *J. Food Prot.* 60:1487-1492.

Toth, I., M. L. Cohen, H. S. Rumschlag, L. W. Riley, E. H. White, J. H. Carr, W. W. Bond, and I. K. Wachsmuth. 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect. Immun.* 58: 1223-1231.

Trompeter, R. S., R. Schwartz, C. Chantler, M. J. Dillon, and G. B. Haycocj. 1983. haemolytic-uremic syndrome: an analysis of prognostic features. *Arch. Dis. Child.* 58: 101-105.

Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, and K. R. Rozee. 1991. Identification of verocytotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment lenght polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1339-1343.

Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Donnenberg, L. deMontigny, J. B. Kaper, and A. Donohue-Rolfe. 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 63:3621-3627.

Tzipori, S., H. Karch, I. K. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers, and M. M. Levine. 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 55: 3117-3125.

Tzipori, S., R. Gibson, and J. Montanaro. 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factor. *Infect. Immun.* 57: 1142-1150.

van Herwaarden, M. A., A. Samson, and A. J. P. M Smout. 1999. 24-h recording of intragastric pH: technical aspects and clinical relevance. *Scand. J. Gastroenterol.* 34 Suppl. 230: 9-16.

Veilleux, C. PCR technology. Disponible au <http://www.biochemucl.ac.uk/~chem/protocols/PCR.html>. Accédé le 20 février 2001.

Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi, and H. Nakanishi. 1997. A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxin in beef by multiplex PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 4127-4131.

Vernozy-Rozand, C. 1997. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microbiol.* 82: 537-551.

Wagner, P. L., D. W. K. Acheson, and M. K. Waldor. 2001. Human neutrophils and their Products induce shiga toxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 1934-1937.

Walker, G. C., B. T. Smith, and M. D. Sutton. 2000. The SOS response to DNA damage *In* Bacterial Stress Response, G. Storz, and R. Hengge-Aronis (ed). ASM Press, Washington, D. C.

Warburton, D. Santé Canada. Identification de *Escherichia coli* O157:H7 au moyen d'anti- *E. coli* O157:H7 Dynabeads. Accédé le 21 février 2003. Disponible au http://www.hc-sc.gc.ca/foodaliment/mhdm/mhedme/compendium/Volume_3/f_mflp99001.html.

Waterman, S. R., and P. L. C. Small. 1996. Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 64: 2808-2811.

Waterman, S. R., and P. L. C. Small. 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. Env. Microbiol.* 64: 3882-3886.

Weagant, S. D., J. L. Bryant, D. H. Bark. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J. Food Prot.* 57: 629-631.

Whipp, S. C., M. A. Rasmussen, and W. C. Cray. 1994. Animals as source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1168-1173.

Willshaw, G. A., H. R. Smith, T. Cheasty, P. G. Wall, and B. Rowe. 1997. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks in England and Wales, 1995: phenotypic methods and genotypic subtyping. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 561-565.

Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Env. Microbiol.* 63:3741-4751.

Yoshida, T., T. Yanashino, C. Ueguchi, and T. Mizuno. 1993. Expression of the *Escherichia coli* dimorphic glutamic acid decarboxylases is regulated by the nucleoid protein H-NS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1568-1569.

Zadic, P. M., P. A. Chapman, and C. A. Siddons. 1993. Use of tellurite for selection of Verotoxinogenic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Med. Microbiol.* 39: 155-158.

Zhao, T., and M. P. Doyle. 1994. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.* 57: 2526-2530.

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