

Maisons-Alfort, le 15 juillet 2008

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme.

#### **Rappel de la saisine :**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 avril 2008 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) d'une demande d'avis relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (STEC) considérées comme pathogènes pour l'homme.

Compte-tenu des récentes données épidémiologiques acquises et des éléments avancés par l'avis de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AES) du 18 octobre 2007 (Anonyme 2007), la DGAL souhaite recueillir l'avis de l'Afssa concernant les sérogroupes de STEC qui doivent faire l'objet d'une surveillance et en conséquence, si nécessaire, réviser la définition des souches STEC pathogènes, proposée dans la note Afssa du 18 avril 2006 (AFSSA 2006). L'Agence est également sollicitée par la DGAL pour identifier les méthodes analytiques applicables pour la recherche des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines, considérées comme pathogènes.

#### **Contexte :**

- **Définitions**

Les *Escherichia coli* producteurs de verotoxines (VTEC) ou de Shigatoxines (STEC) sont caractérisés par la production de cytotoxines qui inhibent la synthèse protéique de certaines cellules eucaryotes.

Les termes pour dénommer ces toxines sont des synonymes :

- Verotoxine (VT) fait appel à l'action de ces toxines sur les lignées cellulaires Vero ;
- Shigatoxine (Stx) est utilisé à cause de la similarité avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae*.

Dans la suite du texte, seul le terme STEC sera utilisé.

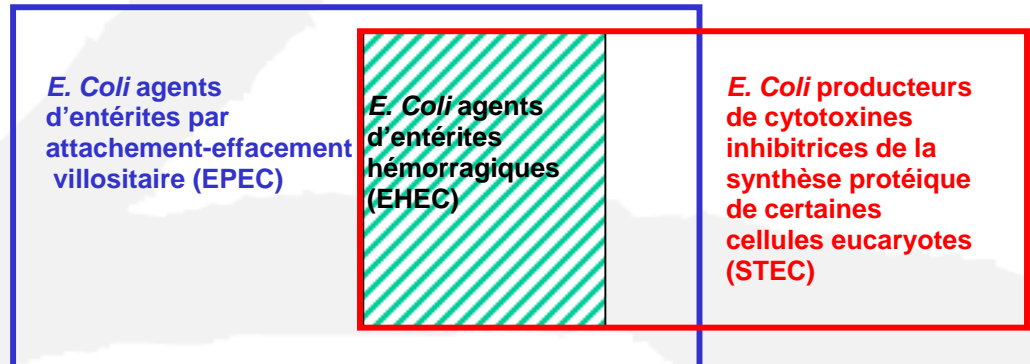
Les infections causées par les STEC constituent un problème majeur en santé publique en raison de l'extrême sévérité des manifestations cliniques qu'ils peuvent générer en particulier les colites hémorragiques mais surtout le syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique post diarrhée particulièrement chez les jeunes enfants et chez les personnes âgées.

- Le terme « *Escherichia coli* entéro-hémorragique » (EHEC), est utilisé pour désigner un sous-ensemble des STEC, considérés comme hautement pathogènes pour l'homme. Les souches EHEC sont isolées chez les malades victimes de diarrhées hémorragiques ou non et/ou de syndrome hémolytique et urémique. Les EHEC produisent les Shigatoxines et provoquent des lésions d'attachement et d'effacement aux cellules intestinales. Ces EHEC possèdent également le plasmide EHEC de 60-MDa (Levine 1987). Le terme de EHEC atypique est aussi utilisé pour désigner des souches STEC qui ne produiraient quant à elles, aucune lésion d'attachement et d'effacement et/ou ne possèderaient pas le large plasmide EHEC (Nataro and Kaper 1998). Les EHEC atypiques ne possèdent pas le gène *eae*.

Il n'y a cependant aucune définition claire du groupe des EHEC, excepté que toutes les souches EHEC, par définition, sont considérées dangereuses pour l'homme parce qu'isolées dans les cas de pathologie humaine.

Il est important de souligner qu'à l'opposé des EHEC, les souches STEC ne sont pas forcément associées à une pathologie chez l'Homme.

Le schéma ci-dessous, modifié de Germani Y. (1994)<sup>1</sup>, rappelle l'articulation existant entre les STEC, EPEC (*E. coli* entéropathogènes) et EHEC.



- **Les STEC et le syndrome hémolytique et urémique**

Les STEC sont responsables de manifestations cliniques variées : colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique post diarrhée ou purpura thrombotique thrombocytopénique (Tarr, Gordon et al. 2005). Le SHU représente la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant de moins de 3 ans. La létalité varie de 3 à 5 %, et plus d'un tiers des malades conservent des séquelles rénales à long terme.

Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés (produits carnés, le lait et les produits laitiers au lait de vache ou de chèvre pasteurisés ou non, et les légumes consommés crus et contaminés par des fèces animales), la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) (Heymann 2004).

- **Données épidémiologiques**

- **Surveillance des infections à STEC**

En France, les infections à STEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. La surveillance des infections à STEC est basée sur la surveillance des SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Elle repose sur un réseau de néphrologues pédiatres de 33 services de pédiatrie de centres hospitaliers universitaires et généraux, répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain, qui participent volontairement depuis 1996 (Decludt, Bouvet et al. 2000; Espié, Grimont et al. 2007).

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

L'infection à STEC est confirmée au Centre National de Référence (CNR) des *Escherichia coli* et *Shigella* et au laboratoire associé au CNR, soit par mise en évidence d'anticorps sériques dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) des huit sérogroupes de STEC les plus

<sup>1</sup> GERMANI Y. Apport de l'épidémiologie et des connaissances physiopathologiques sur les *Escherichia coli* agents d'entérites, pour leur diagnostic microbiologique et moléculaires lors de la coproculture - Annales de l'Institut Pasteur. 1994, vol. 5, n°3, pp. 175-195.

fréquents (O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157), soit par isolement de souches de STEC ou détection par PCR de gènes codant pour les shigatoxines, dans les selles.

Au niveau européen les infections à STEC sont surveillées selon les pays soit directement, soit indirectement par la surveillance des SHU. Les différents systèmes de surveillance existant sont basés soit sur la déclaration obligatoire de la maladie, soit sur un réseau de laboratoires ou de médecins volontaires.

Les pays suivants ont mis en place un système de surveillance direct pour les infections à STEC : Allemagne, Angleterre, Autriche, Belgique, Danemark, Écosse, Espagne, Finlande, Grèce, Irlande, Irlande du Nord, Italie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pays de Galles, Pologne, Portugal, Slovaquie, Suède, Suisse. Onze de ces pays ont aussi mis en place un système de surveillance indirecte pour les cas de SHU (Espíe 2007).

#### ➤ Incidence de SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans

Le système national de surveillance en France a identifié 961 cas de SHU survenus en France entre 1996 et 2006. La quasi-totalité de ces cas de SHU (96%), étaient des formes sporadiques. Quatre-vingts pour cent des cas étaient âgés de moins de 5 ans au moment de l'infection. Cinquante et un pour cent des cas de SHU sont survenus entre les mois de juin et septembre.

Depuis 1996, l'incidence annuelle du SHU sporadique en France reste stable et inférieure à 1/ 100 000 enfants âgés de moins de 15 ans (moyenne : 0,71 / 100 000). L'incidence est plus élevée chez les enfants âgés de moins de 5 ans (moyenne : 1,87 / 100 000). Les incidences régionales les plus élevées se trouvent en Franche-Comté et en Bretagne, des régions où l'incidence annuelle excède le plus souvent la moyenne nationale depuis 1996.

L'incidence annuelle du SHU chez l'enfant âgé de moins de 15 ans observée en Europe continentale varie selon les pays, mais reste du même ordre de grandeur :

- Italie (1988-2000) 0,28/100 000 enfants de moins de 15 ans (Tozzi, Caprioli et al. 2003) ;
- Danemark (1997-2000) 0,67/100 000 enfants de moins de 5 ans (Scheutz, Olesen et al. 2001);
- Allemagne et Autriche (1997-2000) respectivement 0,71/100 000 et 0,36/100 000 enfants de moins de 15 ans (Fischer, König et al. 2001; Gerber, Karch et al. 2002) ;
- Belgique (1996) 0,42/100 000 enfants de moins de 15 ans (Pierard, Crowcroft et al. 1999) ;
- Angleterre, Écosse, Pays de Galles et Irlande du Nord (1997-2001) respectivement 0,71, 1,56, 0,71 et 0,97/100 000 enfants de moins de 16 ans (Lynn, O'Brien et al. 2005).

#### ➤ Les principaux sérogroupes responsables des infections à STEC

Une confirmation microbiologique ou sérologique d'infection à STEC a pu être réalisée pour 66% des cas de SHU survenu en France entre 1996-2006. Parmi les cas de SHU avec isolement d'une souche de STEC, 65% ont présenté en plus une diarrhée sanglante, 27% une diarrhée non-sanglante et 3% étaient sans diarrhée.

Les données de surveillance française (1996-2006) mettent en évidence la prédominance du sérotype O157 (83% des cas) parmi ces infections à STEC confirmées. Plusieurs sérogroupes non O157 ont également été mis en évidence : O26 (6%), O103 (3%), O145 (2%), O91, O111 et O55 (1%). La proportion de sérogroupes non O157 identifiée parmi les souches STEC a augmenté durant les dernières années de 10% (1996-2001) à 23% (2002-2006).

Il faut noter que cette forte prédominance du sérotype O157 est très probablement liée à une sous estimation du nombre réel d'infections à STEC non O157, due à l'absence de stratégies d'isolement efficaces pour ces souches à ce jour.

Dans un certain nombre de pays européens, *E. coli* O157:H7 est le principal sérotype identifié parmi les STEC isolés chez des malades, quelque soient les symptômes présentés: 95%

aux Pays-Bas (Van Duynhoven, De Jager et al. 2002), 89% en Irlande (Carroll, Gibson et al. 2005). En Europe, selon les années considérées, entre 42 et 83 % des SHU étaient liés à *E. coli* O157 (Gerber, Karch et al. 2002; Tozzi, Caprioli et al. 2003; Lynn, O'Brien et al. 2005; Pollock 2005)). Cette variation pourrait s'expliquer par une vraie différence de situation épidémiologique entre pays ou bien par des différences entre les systèmes de surveillance mis en place.

Ces dernières années, le nombre observé d'infections dues à des sérogroupes de STEC non-O157 (O26, O91, O111, O103) est en augmentation. Le nombre d'infections dues aux sérogroupes non-O157, quels que soient les symptômes, rapporté au réseau de surveillance européen des infections à STEC a augmenté de 60% entre 2000 et 2005 comparativement à l'augmentation de 14% observée pour le séro groupe O157 (Enter-net 2006). L'augmentation importante des sérogroupes non-O157 est probablement partiellement imputable à une amélioration de leur identification. Parmi les sérogroupes de STEC non O157, le séro groupe O26 est devenu, au cours de ces 10 dernières années, le plus fréquemment isolé dans les infections à STEC chez l'homme (Nataro and Kaper 1998; Zhang, Bielaszewska et al. 2000; Hiramatsu, Matsumoto et al. 2002; Brooks, Sowers et al. 2005; Tarr, Gordon et al. 2005). Selon les données du réseau Enter-net<sup>2</sup>, depuis 2002 le séro groupe O26 figure au second rang des sérogroupes les plus fréquents et représente 7% des souches de STEC identifiées chez des malades, quels que soient les symptômes. Le séro groupe O157 est le plus fréquent et représente 66% des souches rapportées au réseau (Enter-net 2006). En considérant uniquement les cas de SHU rapportés à ce réseau pendant le même période, les proportions attribuées aux sérogroupes O157 et O26 sont respectivement égales à 69% et 11%.

#### ➤ Cas groupés du SHU en France, 1996-2006

Entre 1996 et 2006, 26 foyers de cas groupés de SHU ont été identifiés par le système de surveillance. Dix-neuf épisodes (73%) comprenaient au moins deux cas de SHU. Les épisodes ont eu lieu en milieu familial, en collectivité et en milieu scolaire.

Parmi les 26 foyers de cas groupés de SHU investigués, une origine alimentaire commune a été identifiée pour trois : en 2004 pour un foyer lié à *E. coli* O157:H7 (fromage au lait cru de chèvre) ; en 2005 pour une épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 (steak haché surgelé de bœuf) et pour une épidémie d'infections à STEC O26:H11 et O80:H2 (camembert au lait cru).

#### ➤ Facteurs de risque du SHU sporadique chez l'enfant de moins de 15 ans en France

En France, presque tous les cas de SHU sont des cas sporadiques. En l'absence de traitement spécifique du SHU et des infections à STEC, il est important d'identifier les facteurs de risque de survenue de ces infections, afin d'élaborer et de mettre en œuvre des mesures de prévention et de contrôle adaptées. Une étude épidémiologique nationale conduite en 2000 et 2001 en France métropolitaine a identifié les facteurs suivants comme des facteurs de risque du SHU sporadique lié à une infection à STEC chez l'enfant de moins de 15 ans :

- Consommation de steak haché peu cuit
- Existence de cas de diarrhée dans la collectivité fréquentée par l'enfant
- Existence de cas de diarrhée dans sa famille dans les 7 jours précédant ou suivant la date de survenue de la diarrhée du cas.

Conséquemment, des recommandations concernant la prévention de la transmission des infections à *E. coli* producteurs de shigatoxines et du syndrome hémolytique et urémique chez l'enfant âgé de moins de 15 ans en France ont été publiées en janvier 2006 par InVS<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> [http://ecdc.europa.eu/documents/ENTER\\_NET/annual\\_report2005.pdf](http://ecdc.europa.eu/documents/ENTER_NET/annual_report2005.pdf)

<sup>3</sup> [http://www.invs.sante.fr/publications/2005/shu\\_161205/shu\\_161205.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2005/shu_161205/shu_161205.pdf), consulté le 17 juin 2008.

- **Contexte réglementaire et enjeux des autocontrôles**

Depuis l'entrée en vigueur du « Paquet hygiène » au 1<sup>er</sup> janvier 2006, les professionnels de l'industrie agroalimentaire ont une obligation de résultat, explicitement définie par l'article 14 du règlement (CE) No 178/2002, portant sur le caractère sûr et sain de la denrée alimentaire et sur la protection de la santé du consommateur. Aucun aliment ne doit être mis sur le marché s'il est dangereux, c'est à dire s'il s'avère préjudiciable pour la santé<sup>4</sup> ou impropre à la consommation<sup>5</sup>, compte-tenu des conditions d'utilisation normales, de l'information fournie au consommateur, de l'effet probable immédiat ou retardé sur la santé, des effets toxiques cumulatifs et éventuellement des sensibilités sanitaires particulières d'une catégorie spécifique de consommateurs.

Selon le règlement (CE) No 178/2002, les exploitants du secteur alimentaire ont l'obligation de mettre en place, sous leur responsabilité, un plan de maîtrise sanitaire comprenant, en particulier, une analyse des dangers et les éléments de maîtrise de ces dangers élaborés selon les principes HACCP. Les analyses microbiologiques réglementaires, voire également non réglementaires selon la spécificité du produit et du procédé de production, sont à intégrer dans ce plan, au titre d'éléments de validation/vérification de l'efficacité du plan de maîtrise sanitaire.

Les critères microbiologiques de sécurité, définis par le règlement (CE) No 2073/2005 modifié<sup>6</sup>, s'appliquent aux produits mis sur le marché et supposent des mesures de gestion en cas de non-conformité (retraits, rappels). Les critères d'hygiène des procédés, définis par ce même règlement, s'appliquent quant à eux en amont de la mise sur le marché des produits et sont éventuellement complétés par d'autres critères microbiologiques établis par l'opérateur. Ils permettent de vérifier l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production, notamment vis à vis de la présence de STEC pathogènes.

L'absence de définition de critères microbiologiques vis à vis des souches STEC pathogènes, au sein du règlement (CE) No 2073/2005 modifié, ne signifie pas que la recherche de ces bactéries soit sans intérêt. En effet, le considérant 14 de ce règlement rappelle l'avis du comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique (CSMV SP du 21-22 janvier 2003), qui souligne que *« des orientations microbiologiques destinées à réduire la contamination fécale dans la chaîne alimentaire peuvent contribuer à réduire les risques pour la santé publique, y compris ceux liés à VTEC. Le comité a identifié les catégories de denrées alimentaires dans lesquelles VTEC présente un risque pour la santé publique. Il s'agit des viandes crues ou peu cuites de bœuf et éventuellement d'autres ruminants, des viandes hachées, de la viande de bœuf fermentée et des produits à base de viande de bœuf fermentée, du lait cru et des produits au lait cru, des produits frais, notamment les graines germées et les jus de fruits et de légumes non pasteurisés. »*.

Suite à une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 liée à une consommation familiale de steak hachés contaminés et insuffisamment cuits, survenue en France en fin d'année 2005, une note d'information interministérielle, destinée aux professionnels de la restauration

<sup>4</sup> Pour déterminer si une denrée alimentaire est préjudiciable à la santé, il est tenu compte :

- de l'effet probable immédiat et/ou à court terme et/ou à long terme de cette denrée alimentaire sur la santé, non seulement d'une personne qui la consomme, mais aussi sur sa descendance,
- des effets toxiques cumulatifs probables,
- des sensibilités sanitaires particulières d'une catégorie spécifique de consommateurs lorsque la denrée alimentaire lui est destinée. (note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009)

<sup>5</sup> Pour déterminer si une denrée alimentaire est impropre à la consommation humaine, il est tenu compte de la question de savoir si cette denrée alimentaire est inacceptable pour la consommation humaine compte tenu de l'utilisation prévue, pour des raisons de contamination, d'origine externe ou autre, ou par putréfaction, détérioration ou décomposition. (note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009)

<sup>6</sup> règlement (CE) No 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, modifié par le règlement (CE) No 1441/2007 du 5 décembre 2007.

collective, a été émise le 13 février 2007. Cette note rappelle l'importance du maintien du steak haché dans le cadre d'une alimentation diversifiée, « source protéique particulièrement appréciée des enfants et des personnes âgées car facile à manger ». Cette même note indique que « des précautions doivent être prises à l'échelle de la filière depuis l'amont (élevage, abattage...) jusqu'à l'aval (restauration) pour maîtriser ce risque ».

Par ailleurs, la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14 janvier 2008 rappelle le contexte et les principaux objectifs recherchés lors de la mise en œuvre des analyses microbiologiques, dans le cadre d'autocontrôles ou de contrôles officiels, et présente des lignes directrices destinées à expliquer comment ces analyses s'intègrent dans le plan de maîtrise sanitaire d'un établissement.

En cas d'autocontrôle positif, la procédure en vigueur, définie par la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8044 du 4 mars 2008 qui concerne la production de viandes hachées et préparations de viande, demande la confirmation des résultats préliminaires par le laboratoire national de référence (LNR). Lorsque celui-ci confirme la présence de *E. coli* O157:H7, des mesures de gestion doivent être mises en œuvre, ce qui peut entraîner le retrait d'un volume important de produits mis sur le marché.

L'obtention d'autocontrôles positifs implique une grande réactivité de la part des professionnels et des gestionnaires du risque. Le périmètre de la contamination doit être défini en urgence. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes fiables et rapides pour détecter les souches de STEC pathogènes dans les produits finis et lors des autocontrôles et tests libératoires. Dans un contexte sanitaire parfois tendu et à la lumière de l'évolution rapide des connaissances scientifiques relatives à la détection et à la caractérisation de ces dangers, les professionnels et les gestionnaires du risque ont aujourd'hui besoin d'orientations et de recommandations claires concernant :

- la définition d'une souche STEC pathogène ;
- les méthodes disponibles pour la recherche du danger défini.

#### **Méthode d'expertise :**

Une expertise initiale a été réalisée par une partie des membres d'un groupe de travail de l'Afssa, ayant récemment mené une analyse quantitative des risques liés aux STEC<sup>7</sup>. Leur rapport initial comportait, d'une part, des éléments de réponse concernant la définition des souches STEC pathogènes pour l'homme et d'autre part, un bilan des méthodes de détection de ces pathogènes. Ce rapport a fait l'objet d'une expertise collective, réalisée par le comité d'experts spécialisé « Microbiologie », le 8 juillet 2008.

Le présent avis présente les éléments de réponse relatifs à la définition des souches STEC pathogènes pour l'homme.

#### **Argumentaire :**

- **Rappel des définitions et des réflexions antérieures :**

Dans le cadre de la surveillance de la contamination de la filière de production « viandes hachées » par les souches STEC, une demande d'appui scientifique et technique a été adressée par la DGAL à l'Afssa, fin décembre 2005. La note du 18 avril 2006 (AFSSA 2006), transmise en réponse, recommandait notamment :

- au regard des données épidémiologiques disponibles et des protocoles validés, de rechercher *a minima* systématiquement les souches *E. coli* O157:H7 possédant les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2*, associé(s) au gène *eae* et d'associer des mesures de gestion en cas de détection ;
- de rechercher idéalement tous les STEC selon la méthode d'analyse définie pour le plan de surveillance relatif à la contamination des fromages au lait cru de chèvre

---

<sup>7</sup> Groupe de travail « AQR STEC » de l'Afssa, ayant récemment mené une analyse quantitative des risques liés aux STEC dans les steaks hachés surgelés, consommés en restauration familiale en France, par les enfants de moins de 16 ans et qui a fait l'objet d'un rapport Afssa (octobre 2007), actuellement en ligne ([www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)).

(DGAL/SDSSA/N2005-8077 du 7 mars 2005) : recherche des gènes *stx*, *eae* et *ehx* et identification des sérogroupes O157:H7, O26, O91, O103, O111 et O145.

La note précisait qu'aucune mesure de gestion ne pouvait être envisagée, suite à la détection d'une souche STEC appartenant à un sérotype différent de ceux mentionnés ci-dessus, le rôle pathogène de ces souches n'étant pas définitivement établi.

Dans sa note du 18 avril 2006, l'Afssa définissait alors les souches STEC pathogènes comme suit : « *Sont considérées comme pathogènes les souches STEC du sérotype O157:H7 et des sérogroupes O26, O111, O145 et O103 ayant comme facteurs de virulence les gènes stx1 et/ou stx2, et eae.* ».

Depuis, l'EFSA s'est autosaisie sur le sujet pour :

- identifier les souches et/ou les sérotypes de VTEC qui sont pathogènes pour l'Homme ;
- donner des recommandations concernant les méthodes analytiques, notamment les tests de recherche de facteurs de virulence, à utiliser pour la détection et l'identification des souches ou des sérotypes de VTEC pathogènes pour l'Homme, d'origine alimentaire et animale ;
- recommander les méthodes de surveillance dans les populations animales et les denrées alimentaires, qui sont optimales du point de vue de la santé publique.

L'avis adopté le 18 octobre 2007 (Anonyme 2007) souligne l'absence de consensus concernant la stratégie optimale permettant de caractériser les facteurs de virulence des VTEC pathogènes. Il conclut qu'il est impossible de définir aujourd'hui entièrement les VTEC pathogènes pour l'Homme. Des méthodes améliorant notamment la détection et l'isolement des souches non O157 à partir de prélèvements d'aliments, d'animaux et de l'environnement doivent être développées et validées. L'EFSA recommande donc qu'une surveillance initiale porte sur les VTEC O157 car ce sérotype est majoritairement associé à de graves infections humaines (notamment les SHU). La surveillance devrait ensuite être étendue à d'autres sérotypes, comme O26, O103, O91, O111 et O145.

L'avis EFSA recommande également que les méthodes utilisées par les Etats membres soient harmonisées pour définir les sérotypotypes de VTEC.

La définition des souches VTEC pathogènes pour l'Homme doit être établie en fonction des connaissances scientifiques et des observations épidémiologiques les plus récentes. De nombreuses publications apportent de nouveaux éléments à prendre en compte pour définir ces souches, à la fois en épidémiologie (cf. introduction) et en biologie moléculaire (comme indiqué ci-après). Ces considérations mettent en exergue le caractère évolutif de la définition recherchée.

#### • Facteurs de virulence, pouvoir pathogène et sérotypotypes

La production de Shigatoxines par les STEC est un facteur essentiel à l'origine du SHU typique post diarrhée. Cependant la plupart des souches STEC non O157:H7 peuvent produire des Shigatoxines sans pour autant être à l'origine de SHU, prouvant par là même que des facteurs de virulence additionnels sont requis pour la maladie.

D'une manière générale, la virulence, au sein des bactéries pathogènes, est modulée par l'acquisition d'éléments génétiques mobiles comme les bactériophages, les transposons, les plasmides et les îlots génomiques. (Lawrence 2005). Une classe, parmi ces îlots génomiques s'appelle « îlot de pathogénicité » : ces îlots portent des gènes qui sont des facteurs de virulence responsables de l'infection de l'hôte (Hacker and Kaper 2000; Dobrindt, Hochhut et al. 2004).

Ces îlots de pathogénicité constituent un regroupement exogène de gènes mobilisables contribuant et expliquant le pouvoir pathogène des souches. Ils sont une signature de l'émergence de pathogènes nouveaux.

### ➤ Les shigatoxines

Le facteur de pathogénicité majeur des EHEC est la production de Shiga-toxines Stx. Ces toxines sont constituées d'une sous-unité A (pour Activité) et de 5 sous-unités B (pour Binding ou liaison au récepteur). La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase qui entraîne un arrêt total des synthèses protéiques, et la mort de la cellule eucaryote cible. Deux grands types de Shiga-toxines ont été identifiés : Stx1 et Stx2 qui possèdent respectivement 99% et 56% d'homologies avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Paton et Paton, 1998). Les études réalisées *in vitro*, et *in vivo* sur des modèles animaux ont montré que Stx2 est une toxine environ mille fois plus puissante que Stx1 (Louise and Obrig 1995) ; les données épidémiologiques ont confirmé que Stx2 est associée aux cas les plus sévères chez l'homme ((Boerlin, McEwen et al. 1999; Friedrich, Bielaszewska et al. 2002; Jelacic, Damrow et al. 2003). Cependant, les souches STEC O26:H11, O103:H2, ou O111:H, classiquement impliquées dans des cas de SHU, peuvent ne produire que le type Stx1.

De très nombreux variants de Stx1 et Stx2 ont été décrits sur la base de la toxicité, du récepteur reconnu par les sous unités B, de la séquence en acides aminés, ou de la séquence nucléotidique des gènes. Parmi les principaux variants décrits, figurent trois variants de Stx1 (Stx1-933J, Stx1c, Stx1d) et dix variants de Stx2 : Stx2-EDL933, Stx2c (Stx2vh-a, Stx2vh-b), Stx2d (Stx2d-Ount aussi appelé Stx2-O118, Stx2d-OX3a), Stx2e, Stx2f, Stx2-NV206 (Piérard, Muyldermans et al. 1998; Bertin, Boukhors et al. 2001; Beutin, Miko et al. 2007). A l'heure actuelle, on considère que le type de variant reflète à la fois l'origine des souches (moutons, porcs), leur phylogénie, mais aussi leur pouvoir pathogène. Par exemple, les variants associés à des souches STEC isolées chez les ovins (Stx1c, Stx2d-O118), les porcins (Stx2e), ou les pigeons (Stx2f) sont très peu présents dans les souches pathogènes isolées chez l'homme. Si toutefois ils sont présents, ils sont associés à des diarrhées sans gravité (Ramachandran, Hornitzky et al. 2001; Friedrich, Bielaszewska et al. 2002; Brett, Ramachandran et al. 2003; Beutin, Krause et al. 2004; Fratamico, Bagi et al. 2004). De même, le variant *stx*<sub>2-NV206</sub> est un bon marqueur des souches non virulentes. Au contraire, le variant *stx*<sub>2-vhb</sub> est associé aux souches ne possédant pas le gène *eae* mais isolées de cas sporadiques de SHU, alors que *stx*<sub>2-EDL933</sub> est associé aux souches les plus pathogènes (Girardeau, Dalmaso et al. 2005; Pradel, Bertin et al. 2008).

### ➤ Le facteur d'attachement et d'effacement

D'autres facteurs ont été associés à la pathogénicité des EHEC. La colonisation du tube digestif par ces souches est facilitée par le développement de lésions spécifiques des entérocytes, dites d'attachement-effacement (A/E). Les gènes impliqués sont portés par un îlot de pathogénicité, le "locus of enterocyte effacement" (LEE) (McDaniel, Jarvis et al. 1995). Parmi ceux-ci, figurent le gène *eae* codant l'intimine une protéine de membrane externe impliquée dans la liaison étroite bactérie-cellule, le gène *tir* codant le récepteur spécifique de l'intimine Tir (Translocated Intimin Receptor), protéine injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce à un système de sécrétion de type III (dont les gènes sont également portés par le LEE).

Plusieurs types d'intimine ont été identifiés ; ils constituent des marqueurs de phylogénie, mais sont aussi probablement impliqués dans le tropisme d'hôte donc dans le pouvoir pathogène (Adu-Bobie, Frankel et al. 1998; Oswald, Schmidt et al. 2000). Les séquences d'environ 25 types et sous-types d'intimine ont été déposées dans les banques de données ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\xi$ R/ $\beta$ 2B,  $\delta$ / $\beta$ 2O,  $\beta$ 3,  $\kappa$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\theta$ ,  $\varepsilon$ 1,  $\nu$ R/ $\varepsilon$ 2,  $\zeta$ ,  $\eta$ 1,  $\eta$ 2,  $\iota$ 1,  $\mu$ R/ $\iota$ 2,  $\lambda$ ,  $\mu$ B,  $\nu$ B,  $\xi$ B,  $\omicron$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ , et  $\sigma$ ). Parmi les principaux types, l'intimine  $\alpha$  est retrouvée chez les EPEC isolés chez l'homme. L'intimine  $\beta$  a été mise en évidence chez des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et EHEC de sérotype O26:H11 et O111:H isolées chez l'homme et les animaux, ainsi que chez *Citrobacter rodentium*. L'intimine  $\gamma$  a été mise en évidence chez des EPEC et EHEC de sérotype O157:H7 isolés chez l'homme et les bovins, ainsi que chez les souches d'EHEC de sérotype O145:H28. L'intimine  $\delta$  a été mise en évidence de façon plus anecdotique, et l'intimine  $\varepsilon$  est retrouvée chez les EHEC de sérotype O103:H2 isolés chez l'homme et les bovins. Plusieurs variants ont également été décrits pour les gènes *tir*, *espA* et *espB*.



### ➤ Autres facteurs de virulence

Enfin, des facteurs de virulence potentiels dont les gènes sont plasmidiques ont été étudiés : une entérohémolysine (E-hlyA) codée par le gène *ehxA*, une sérine protéase EspP, une catalase peroxydase périplasmique KatP (Paton and Paton 1998). Cependant, leur implication dans la pathogénicité reste encore à démontrer.

### ➤ Les « O Islands »

Les O Islands sont des îlots de pathogénicité mis en évidence notamment à l'occasion du séquençage des deux souches épidémiques de *E. coli* O157:H7 (la souche EDL 933 et la souche SAKAI). Ces îlots génétiques sont présents uniquement dans *E. coli* O157:H7 et non dans les souches de *E. coli* K12, souche communément utilisée au laboratoire et ne présentant aucun pouvoir pathogène. Au total, 177 O Islands ont été identifiés à l'occasion de ces séquençages (Hayashi, Makino et al. 2001; Perna, Plunkett et al. 2001). Certains îlots génomiques O Island pourraient être des îlots de pathogénicité notamment les OI36, OI43, OI48, OI71, OI115, OI122, OI140, OI141 et OI154.

Presque rien n'est connu sur le rôle potentiel de ces nouveaux îlots de pathogénicité découverts dans la virulence de *E. coli* O157:H7. Leur présence dans les STEC non O157 ou même leur rôle ne sont pas complètement élucidés à ce jour. L'hypothèse faite par Karmali et al. (Karmali, Mascarenhas et al. 2003), a été que certains de ces O Island nouvellement identifiés, pouvaient contribuer à des expressions différentes du pouvoir pathogène parmi les différents sérotypes de STEC.

Il est apparu à cette équipe que l'îlot O Island 122 de la souche EDL 933, nommé SPLE 3 pour la souche SAKAI, pouvait constituer un candidat extrêmement prometteur pour des investigations complémentaires sur la virulence. Plus particulièrement, ils ont investigué la distribution de cet îlot OI122 dans une collection de 70 souches de EHEC appartenant à différents sérotypes et associées à différentes pathologies chez des patients.

Il est apparu que l'îlot OI122, contenant 4 gènes de virulence (ZA321, ZA326, ZA332 et ZA333) est complet (présence concomitante des 4 gènes) pour les souches associées à des épidémies ou à des SHU.

D'une manière générale, plus cet îlot de pathogénicité est incomplet (absence de 1, 2, 3 des 4 gènes) moins la pathologie associée aux EHEC est grave. C'est ainsi que Karmali et al. en 2003 ont pu classer les souches STEC en séropathotypes tenant compte de leur sérotype, mais aussi de leurs caractéristiques de virulence.

### ➤ Les séropathotypes

Pour évaluer le risque associé aux STEC, l'équipe de Karmali a en effet choisi de définir cinq séropathotypes (A à E) en fonction de l'incidence des souches et de leur association avec les épidémies et avec les infections humaines sévères (SHU) ou modérées (Karmali, Mascarenhas et al. 2003). Le séropathotype A comprend les sérotypes O157:H7 et O157:NM, qui sont les causes les plus fréquentes d'épidémies et de SHU ; les souches de séropathotype B sont associées moins fréquemment aux SHU et aux épidémies (elles appartiennent par exemple aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 et O145:NM) ; les souches de séropathotype C sont associées à des cas sporadiques de SHU, mais pas à des épidémies (par exemple, O91:H21 ou O113:H21); les souches de séropathotype D sont associées à des diarrhées (mais pas à des SHU, ni à des épidémies) ; les souches de séropathotype E correspondent aux très nombreux sérotypes qui n'ont jamais été impliqués dans des cas humains et semblent liés exclusivement au réservoir animal.

- **Définition des « EHEC typiques »**

Depuis la description de souches d'*E. coli* productrices de Shigatoxine (STEC) en 1977 (Konowalchuk, Speirs et al. 1977), près de 200 sérotypes d'*E. coli*, capables de produire les Shigatoxines (vérotoxines), ont été décrits (Scheutz and Strockbine 2005).

Les données épidémiologiques dans le monde montrent qu'un nombre limité de sérotypes de STEC est associé à l'apparition de symptômes cliniques sévères chez l'homme comme la colite hémorragique ou le SHU (Karmali, Mascarenhas et al. 2003). Aujourd'hui, c'est sur la base de l'apparition de ces symptômes cliniques que l'on définit un *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC).

En complément du sérotype O157:H7 qui est le plus fréquemment retrouvé, les EHEC comptent 4 autres sérogroupe majeurs, classés ici selon leur importance décroissante décrite dans le rapport de l'EFSA (Anonyme 2007)) : O26, O145, O103 et O111. Il faut noter par ailleurs qu'au sein de chaque sérogroupe d'*E. coli* coexistent des souches pathogènes (EHEC) et des souches non pathogènes. Dans ces conditions, il peut exister des souche d'*E. coli* O157, O26, O145, O103 et O111 qui ne sont pas pathogènes. Comment définir alors les 'EHEC typiques' responsables de la majorité des cas cliniques ? La réponse à cette question nécessite de définir complètement outre l'antigène somatique, l'antigène flagellaire et le profil de virulence des souches (présence et typage des gènes *stx* et *eae*, présence d'îlots de pathogénicité comme OI#122).

Les sérotypes O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 et O111:H8 appartiennent aux 'EHEC typiques'. Ces souches sont capables de produire un ou deux types antigéniques de Shigatoxines (Stx1, Stx2) et possèdent l'îlot de pathogénicité LEE (Locus of Enterocyte Effacement) capable d'induire l'effacement des microvillosités intestinales des entérocytes. Le gène *eae* appartenant à ce locus est directement impliqué dans l'attachement de la bactérie aux entérocytes et dans l'apparition des lésions d'effacement des microvillosités (lésions A/E). La littérature récente (Coombes, Wickham et al. 2008) rapporte aussi la prépondérance d'autres îlots, comme le OI#122, dans ces souches d'EHEC. Il faut enfin noter qu'au sein des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* de nombreux variants ont été décrits et que leur nombre est en constante augmentation (Scheutz and Strockbine 2005). **C'est la mise en évidence de ces différents facteurs au sein d'une même souche qui permet de confirmer le caractère pathogène d'une souche EHEC.**

Les 'EHEC typiques' majoritairement impliqués dans les SHU peuvent être définis selon les critères génétiques suivants, en tenant compte des données disponibles actuellement :

- EHEC O157:H7 = *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122).
- EHEC O26:H11 = *wzx*<sub>O26</sub>, *fliC*<sub>H11</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-beta, (OI#122).
- EHEC O145:H28 = *ihp1*<sub>O145</sub>, *fliC*<sub>H28</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122).
- EHEC O103:H2 = *wzx*<sub>O103</sub>, *fliC*<sub>H2</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-epsilon, (OI#122).
- EHEC O111:H8 = *wbd1*<sub>O111</sub>, *fliC*<sub>H8</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-theta, (OI#122).

En l'état actuel des connaissances, la détection de l'îlot O Island 122 conforte sur la virulence de la souche et l'absence de détection n'apporte pas la preuve d'un défaut de virulence. Le sérogroupe O91 n'est pas retenu dans la définition des 'EHEC typiques' majeurs car les souches appartenant à ce sérogroupe sont très minoritairement impliquées dans les cas de SHU recensés en France.

### **Conclusions :**

En conclusion, voici les éléments qui peuvent être transmis d'après le niveau de connaissance scientifique actuellement validé, pour répondre à la question concernant la définition des souches *E. coli* STEC pathogènes.

A ce jour, les souches STEC pathogènes, aussi nommées dans le corps du texte « EHEC typiques majeurs », peuvent être définies selon les critères génétiques suivants :

EHEC O157:H7 = *rfbE*<sub>O157</sub>, *flic*<sub>H7</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122).  
EHEC O26:H11 = *wzx*<sub>O26</sub>, *flic*<sub>H11</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-beta, (OI#122).  
EHEC O145:H28 = *ihp1*<sub>O145</sub>, *flic*<sub>H28</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122).  
EHEC O103:H2 = *wzx*<sub>O103</sub>, *flic*<sub>H2</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-epsilon, (OI#122).  
EHEC O111:H8 = *wbd1*<sub>O111</sub>, *flic*<sub>H8</sub>, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-theta, (OI#122).

Les formules antigéniques sont détaillées car l'appartenance à un sérotype (O26, par exemple) ne peut préjuger à elle seule de la pathogénicité des souches.

Il faut souligner le caractère temporaire de la définition proposée. Celle-ci devra être révisée en fonction des nouvelles observations cliniques, des résultats d'investigations épidémiologiques, en fonction des résultats des projets de recherche et du développement de méthodes fines.

Le niveau de précision, relatif à la caractérisation génétique des souches, intégré dans la nouvelle définition proposée, est accru en comparaison de la précédente définition qui figurait dans la note Afssa du 18 avril 2006. L'évolution de cette définition pourrait nécessiter une adaptation des modalités de contrôles effectués, lors des inspections ou dans le cadre des plans de surveillance réalisés par les gestionnaires, dans le respect du règlement (CE) n°2073/2005, si les méthodes de détection sont disponibles.

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de l'alimentation (DGA) du 25 avril 2008 concernant une demande d'avis relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme.

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments

Pascale BRIAND

**Mots clés** : définitions, *Escherichia coli*, virulence, pathogène.

**Principales références bibliographiques :**

- Adu-Bobie, J., G. Frankel, et al. (1998). "Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens." *J Clin Microbiol* **36**(3): 662-8.
- AFSSA (2006). Note de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative à la surveillance de la contamination par *E. coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées. Note, AFSSA.
- Anonyme (2007). "Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types." *The EFSA Journal* **5**79: 1-61.
- Bertin, Y., K. Boukhors, et al. (2001). "Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors." *J Clin Microbiol* **39**(9): 3060-5.
- Beutin, L., G. Krause, et al. (2004). "Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period." *J Clin Microbiol* **42**(3): 1099-108.
- Beutin, L., A. Miko, et al. (2007). "Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes." *Appl Environ Microbiol* **73**(15): 4769-75.
- Boerlin, P., S. A. McEwen, et al. (1999). "Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans." *J Clin Microbiol* **37**(3): 497-503.
- Brett, K. N., V. Ramachandran, et al. (2003). "stx1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle." *J. Clin. Microbiol.* **41**: 926-936.
- Brooks, J. T., E. G. Sowers, et al. (2005). "Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002." *J Infect Dis* **192**(8): 1422-9.
- Caprioli, A., I. Luzzi, et al. (1994). "Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*." *J Infect Dis* **169**(1): 208-11.
- Carroll, A. M., A. Gibson, et al. (2005). "Laboratory-based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002-2004." *J Med Microbiol* **54**(Pt 12): 1163-9.
- Coombes, B. K., M. E. Wickham, et al. (2008). "Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains." *Appl Environ Microbiol* **74**(7): 2153-60.
- Decludt, B., P. Bouvet, et al. (2000). "Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Societe de Nephrologie Pédiatrique." *Epidemiol Infect* **124**(2): 215-20.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, et al. (2004). "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." *Nat Rev Microbiol* **2**(5): 414-24.
- Espié, E. (2007). Contribution à la connaissance de l'épidémiologie des infections à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines chez l'homme, à partir de l'expérience française. Thèse de l'Université Claude Bernard, Lyon 1.
- Espié, E., F. Grimont, et al. (2007). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2006, Institut de veille sanitaire, <http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/default.htm>.
- Fischer, H., P. Konig, et al. (2001). "Hemolytic-uremic syndrome surveillance to monitor trends in infection with *Escherichia coli* O157 and non-O157 enterohemorrhagic *E. coli* in Austria." *Pediatr Infect Dis J* **20**(3): 316-8.
- Fratamico, P. M., L. K. Bagi, et al. (2004). "Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study." *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7173-7178.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, et al. (2002). "*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms." *J. Infect. Dis.* **185**: 74-84.

- Gerber, A., H. Karch, et al. (2002). "Clinical course and the role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic –uremic syndrome in pediatric patients 1997-2000 in Germany and Austria : a prospective study." *J Infect Dis* **186**: 493-500.
- Girardeau, J. P., A. Dalmasso, et al. (2005). "Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates." *J Clin Microbiol* **43**(12): 6098-107.
- Hacker, J. and J. B. Kaper (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-79.
- Hayashi, T., K. Makino, et al. (2001). "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12." *DNA Res* **8**(1): 11-22.
- Heymann, D. L. (2004). Control of communicable diseases manual. 18th edition ed. Washington DC, USA.
- Hiramatsu, R., M. Matsumoto, et al. (2002). "Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains." *J Clin Microbiol* **40**(3): 922-5.
- Jelacic, J. K., T. Damrow, et al. (2003). "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles." *J. Infect. Dis.* **188**: 719-729.
- Karmali, M. A., M. Mascarenhas, et al. (2003). "Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease." *J Clin Microbiol* **41**(11): 4930-40.
- Konowalchuk, J., J. I. Speirs, et al. (1977). "Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*." *Infect Immun* **18**(3): 775-9.
- Lawrence, J. G. (2005). "Common themes in the genome strategies of pathogens." *Curr Opin Genet Dev* **15**(6): 584-8.
- Levine, M. M. (1987). "*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent." *J Infect Dis* **155**(3): 377-89.
- Louise, C. B. and T. G. Obrig (1995). "Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells." *J Infect Dis* **172**(5): 1397-401.
- Lynn, R. M., S. J. O'Brien, et al. (2005). "Childhood hemolytic uremic syndrome, United Kingdom and Ireland." *Emerg Infect Dis* **11**(4): 590-6.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, et al. (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 1664-1668.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.
- Oswald, E., H. Schmidt, et al. (2000). "Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant." *Infect. Immun.* **68**: 64-71.
- Paton, J. C. and A. W. Paton (1998). "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections." *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
- Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, et al. (2001). "Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Nature* **409**(6819): 529-33.
- Pierard, D., N. Crowcroft, et al. (1999). "A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*." *Epidemiol Infect* **122**(3): 359-65.
- Piérard, D., G. Muyltermans, et al. (1998). "Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates." *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3317-3322.
- Pollock, K. (2005). "Enhanced surveillance of haemolytic uraemic syndrome and other thrombotic microangiopathies in Scotland, 2003-2004." *Euro Surveill* **10**(5): E050519 5.
- Pradel, N., Y. Bertin, et al. (2008). "Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from haemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France." *Appl Environ Microbiol.* **74**: 2118-28.

- Ramachandran, V., M. A. Hornitzky, et al. (2001). "The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type." *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1932-1937.
- Scheutz, F., B. Olesen, et al. (2001). Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) from Danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. In : Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell DA. Editors of Conference Proceedings on Epidemiology of Verototoxigenic *E. coli* organised by EU Concerted Action (CT98-3935) in Malahide, Dublin, Ireland 8-10th February 2000.
- Scheutz, F. and N. A. Strockbine (2005). Genus 1. *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*. D. J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Michigan USA. **2**: 607-623.
- Tarr, P. I., C. A. Gordon, et al. (2005). "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome." *Lancet* **365**: 1073-1086.
- Tozzi, A. E., A. Caprioli, et al. (2003). "Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000." *Emerg Infect Dis* **9**: 106-108.
- Van Duynhoven, Y. T., C. M. De Jager, et al. (2002). "Enhanced laboratory-based surveillance of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in The Netherlands." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 513-522.
- Zhang, W. L., M. Bielaszewska, et al. (2000). "Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains." *J Clin Microbiol* **38**(6): 2134-40.