

Questions et leçons clefs tirées de l'épidémie française de 2011 liée aux graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4

Delphine Sergentet-Thevenot (1,2) (delphine.sergentet@vetagro-sup.fr), Patricia Mariani-Kurkdjian (3), Christine Mazuy-Cruchaudet (1,2), Sarah Ganet (1,2), Malika Gouali (4), Valérie Vallet-Goyard (5), Patrick Fach (6), Renaud Lailier (6), Lisa King (7), Nathalie Jourdan (7), Estelle Loukiadis (1,2), Aurélie Kuakivi (8), Anselme Agbessi (9), Marie Lehouck (10), Frédéric Vey (11), Hélène Callon (10), Nathalie Pihier (10)

(1) Université de Lyon, VetAgro Sup, LMAP-Laboratoire national de référence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines, Marcy L'Etoile, France

(2) Université de Lyon, UM R5557 Ecologie microbienne, CNRS, VetAgro Sup, Equipe BPOE, Université de Lyon 1, France

(3) Centre national de référence associé *Escherichia coli*, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France

(4) Institut Pasteur, Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella*, Paris, France

(5) DGCCRF, Laboratoire service commun des laboratoires, Oullins, France

(6) Université Paris-Est, Anses, Maison-Alfort, France

(7) Institut de Veille Sanitaire, Département des maladies infectieuses, Saint Maurice, France

(8) Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Unité d'alerte, Paris, France

(9) Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Bureau 4B, Paris, France

(10) Direction générale de l'alimentation, Mission des urgences sanitaires, Paris, France

(11) Direction générale de l'alimentation, Bureau de la biovigilance, des biotechnologies et de la qualité des végétaux, Paris, France

Résumé

En Allemagne, une épidémie de grande ampleur a été rapportée suite à la consommation de graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4. Il s'agissait d'une souche pathogène émergente. Peu de temps après (en juin 2011), quinze cas de SHU ou de diarrhée sanglante ont été signalés en France. Les enquêtes épidémiologiques, microbiologiques et de traçabilité menées ont montré que des graines germées contaminées par la même souche de *E. coli* O104:H4 que celle isolée en Allemagne et de même provenance étaient à l'origine de la contamination.

L'une des principales leçons à tirer de cette épidémie est que la souche épidémique *E. coli* O104:H4 impliquée était une souche entero-agrégative. Il existe à ce jour très peu de données sur les souches de STEC dans les graines et les graines à germer, et les méthodes de détection disponibles doivent être optimisées. Enfin, cette épidémie a montré une mobilisation très rapide et coordonnée des institutions et des laboratoires, limitant ainsi la propagation de l'épidémie en France.

Mots-clés

E. coli O104:H4, graines germées, SHU

Abstract

Feedback report on the 2011 outbreak due to sprouts contaminated by *E. coli* O104:H4

In May and June 2011, a major outbreak involving shigatoxin producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 occurred in Germany. More than 3,000 people were reported ill including 845 cases of hemolytic-uremic syndrome (HUS) and 54 deaths. The outbreak was attributed to the consumption of STEC-contaminated fenugreek sprouts. Shortly after this, in June 2011, 15 cases of HUS and bloody diarrhea were reported in France, caused by contamination by the same E. coli strain served in a meal at a children's day camp. The identified source of the outbreak was the same sprouts implicated in the German outbreak.

The strains which caused both outbreaks were genetically related. They belonged to the O104:H4 serotype and possessed the stx2 gene (variant stx2a) encoding the Stx2 toxin. It did not possess the eae gene (encoding intimine), but did harbour the aggR gene encoding a factor regulating the expression of fimbriae responsible for high adherence to the intestinal mucosa and enabling it to produce biofilms (like enteroaggregative E. coli (EAggEC)). These two outbreaks highlight a lack of studies on STEC associated with plant-based products in general and on E. coli O104:H4 in particular, as well as a need to improve control strategies.

Keywords

E. coli O104:H4, Sprouts, SHU

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des agents pathogènes majeurs en santé publique. Ils sont à l'origine de colites hémorragiques sévères, mais également de syndromes hémolytiques et Urémiques (SHU). Ces SHU sont à ce jour, la principale cause d'insuffisance rénale aigue chez l'enfant âgé de un mois à trois ans. L'Homme est principalement exposé suite à la consommation d'aliments contaminés, tels que les produits carnés et les végétaux consommés crus ou insuffisamment cuits et les produits laitiers à base de lait cru (Afssa, 2003).

En Allemagne, une épidémie de grande ampleur a été rapportée suite à la consommation de graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4. Il s'agissait d'une souche pathogène émergente considérée comme non pathogène selon la définition de l'Anses. Peu de temps après (en juin 2011), quinze cas de SHU ou de diarrhée sanglante ont été signalés en France. Des graines germées contaminées par la même souche d'*E. coli* O104:H4 étaient à l'origine de la contamination.

L'objectif de cet article est de synthétiser les enseignements tirés de cette épidémie française. Il est articulé en deux parties destinées respectivement à décrire l'épidémie, puis à en tirer les questions et leçons.

Description de l'épidémie

Le 22 juin 2011, l'hôpital d'instruction des armées Robert Picqué à Bordeaux a signalé à l'Institut de veille sanitaire (InVS), l'admission de huit adultes présentant des diarrhées sanglantes et des SHU. Le 28 juin 2011, sept autres cas ont été identifiés et investigués. Au total, 24 cas épidémiques et deux cas secondaires ont été identifiés (dont 9 cas de SHU).

Investigations épidémiologiques

Les huit premiers cas ont été interrogés à l'aide d'un questionnaire standardisé et semi structuré recueillant les données liées à leurs consommations alimentaires, leurs voyages et leurs contacts avec d'autres personnes souffrant de diarrhée dans les sept jours précédant l'apparition des symptômes. En l'absence de résultats, un second questionnaire explorant en détail la consommation de légumes dans les deux semaines précédant la maladie a été élaboré. Ce questionnaire a mis en évidence une association forte et significative entre la consommation de graines germées de fenugrec lors d'un buffet servi le 8 juin 2011 lors de la journée portes ouvertes d'un centre de loisirs et la survenue de la maladie (King et al., 2011).

Investigations microbiologiques

Souches isolées de cas cliniques

Des analyses effectuées chez les malades ont confirmé une infection à *E. coli* O104:H4. En effet, l'infection a été confirmée chez douze cas (10 cas primaires et 2 cas secondaires) dont onze par un isolement de la souche EHEC O104:H4 et un par une sérologie positive à *E. coli* O104.

La souche épidémique appartenait au sérotype O104:H4 et possédait le gène *stx2* (variant *stx2a*) qui code la toxine Stx2. Elle ne possédait pas les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant la toxine EAST1) mais hébergeait le gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae responsables d'une très forte adhérence à la muqueuse intestinale et qui lui confèrent la capacité à former des biofilms (Safadi *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette souche présentait un profil de multi-résistance aux antibiotiques (présence du gène *blaCTX-M-15* codant une bêta-lactamase à spectre étendu et celle du gène *blaTEM* codant une pénicillinase).

Les caractéristiques phénotypiques et génétiques de cette souche ainsi que son profil de résistance aux antibiotiques, ont montré que cette souche était liée à la souche responsable de l'épidémie déclarée en Allemagne. De plus, deux outils de biologie moléculaire, la Rep-PCR (Repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)) employés pour comparer les souches isolées de patients français et allemands ont montré que ces souches étaient génétiquement liées et proches (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2011). Néanmoins, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire plus fins (séquençage de l'ADN complet des souches) (Gay *et al.*, 2012) a montré que les souches françaises présentaient un nombre légèrement plus élevé de mutations ponctuelles que les souches allemandes (Grad *et al.*, 2012). Enfin, des souches d'*E. coli* O104:H4 isolées en Suède chez des patients ayant voyagé en Allemagne et ayant déclaré les premiers signes cliniques avant le pic épidémique allemand présentaient des mutations ponctuelles (SNPs) spécifiques des souches françaises et pour d'autres, spécifiques des souches allemandes. Cette observation suggère l'existence d'au moins deux géno-groupes au sein de ces souches, résultant d'une expansion clonale après distribution des lots de graine ou encore d'une répartition inégale des géno-groupes dans les lots de graines (Guy *et al.*, 2012).

Analyses des graines germées suspectes

Une méthode officielle et harmonisée pour la recherche de souches STEC O104:H4 dans les aliments a été diffusée par le Laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE) et appliquée au Laboratoire national de référence des STEC (LNR VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon). Il s'agit de la méthode classiquement employée pour la détection des STEC dans les aliments (CEN/ISO TS 13136S) qui a été adaptée et optimisée pour la détection de souches STEC dans les graines germées (prise d'essai de 50 g de graines à germer écrasées afin de libérer les bactéries éventuellement présentes dans les graines). Après enrichissement en bouillon nutritif, l'ADN des bactéries présentes a été extrait et une recherche des gènes *eae* et *stx* a été effectuée. En cas de résultat positif pour le gène *stx2* et négatif pour le gène *eae*, le gène associé au sérotype O104 (*wzxO104*) a été recherché dans l'échantillon.

Une étape de confirmation a été mise en œuvre pour les échantillons présentant des résultats de PCR positifs pour les gènes *stx2* et *wzxO104*. Ainsi, les bouillons d'enrichissement ont été ensemencés sur des géloses Mc Conkey, un milieu TBX ou tout autre milieu permettant l'isolement d'*E. coli*, ainsi que sur un deuxième milieu plus sélectif contenant un supplément d'antibiotique (ChromAgar STEC O104). Les colonies possédant le gène *stx2* ont été sélectionnées et testées pour rechercher la présence des gènes *wzxO104* et *fliC* H4, qui codent respectivement pour les antigènes O104 et H4 selon une méthode PCR précédemment développée au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses et utilisée par le LRUE dans le cadre de l'épidémie allemande (Bugarel *et al.*, 2010).

Une seconde méthode non officielle mise au point par le LNR allemand (Federal Institute for Risk Assessment, BfR) lors de l'épidémie allemande a été employée en parallèle par le LNR français pour l'analyse des

graines. Cette méthode, qui incluait la germination des graines mettant en œuvre des conditions d'hygrométrie et des températures favorables au développement bactérien avait pour objectif de favoriser une reprise de croissance des bactéries stressées présentes à la surface et à l'intérieur des graines.

Aucun résultat positif n'a été obtenu sur les échantillons analysés, et ce, quel que soit le protocole appliqué.

Mesures de contrôle

Les enquêtes épidémiologiques et de traçabilité menées dans les deux pays et au niveau communautaire ont permis d'établir une source commune de contamination pour les épidémies allemande et française, un lot de graines de fenugrec importé d'Égypte en 2009. La Commission européenne a pris le 6 juillet 2011 des mesures d'urgence (décision d'exécution 2011/402/UE) visant à retirer du marché, analyser et détruire les lots incriminés de graines de fenugrec importées d'Égypte en Europe entre 2009 et 2011 et à interdire la mise en libre pratique, au sein de l'Union, des graines en provenance d'Égypte listées en annexe de la décision susmentionnée.

Les autorités françaises ont, pour leur part, étendu les mesures d'urgence prises par la Commission européenne en ordonnant la suspension de la mise sur le marché de tous les lots de graines de fenugrec importés d'Égypte depuis 2009 et des lots de graines et fèves provenant d'Égypte, mentionnées dans l'annexe de la décision d'exécution 2011/402/CE, et mises en libre pratique sur le territoire de l'Union européenne avant la mise en place des mesures d'urgence. Le retrait et la destruction de tous les lots de graines de fenugrec germées ou destinées à la germination importés d'Égypte au cours de la période 2009-2011 et présents sur le territoire français ont également été ordonnés. Les mesures prises au niveau national s'appliquaient jusqu'au 31 octobre 2011.

Questions et leçons clés tirées de l'épidémie

Quelles données sont disponibles sur les STEC et les graines germées ?

Très peu de données sont disponibles sur la prévalence des STEC dans les graines et les graines germées. Néanmoins, des souches de STEC O157:H7 ont été à l'origine d'épidémies de grande ampleur associées à la consommation de graines germées de radis et de luzerne, respectivement au Japon et aux États-Unis (CDC, 1997; Watanabe *et al.*, 1999). Les origines et voies de contamination des graines ne sont pas documentées. Néanmoins, les graines étant des produits agricoles, les voies de contamination notamment fécales peuvent être diverses et variées (EFSA 2011). L'EFSA considère donc que les végétaux tels que les graines germées, les fruits et les jus de fruits non pasteurisés sont des véhicules de transmission importants des STEC (EFSA 2011).

E. coli O104:H4, une souche émergente ?

Les récentes épidémies allemande et française (juin et juillet 2011) épidémiologiquement reliées à la consommation de graines germées ont été associées à une souche EAggEC (*E. coli* entero-aggrégative). Cette souche avait acquis la capacité de produire des Shiga-toxines suite à un transfert horizontal de gènes par un bactériophage (Rasko *et al.*, 2011). L'origine de la souche épidémique et la voie de contamination des graines n'ont pas été identifiées. Néanmoins, le séquençage du génome complet de la souche épidémique allemande a montré qu'il s'agit d'une souche entero-aggrégative (EAggEC). Ces souches sont fréquemment isolées du tube digestif de l'Homme. Certains ont donc émis l'hypothèse que les graines aient pu être contaminées par l'Homme (Soon *et al.*, 2013).

Des méthodes de détection des STEC dans les graines à optimiser ?

À l'exception d'un prélèvement effectué sur le reste de graines germées présent dans un sachet récupéré chez un malade allemand,

la bactérie *E. coli* O104:H4 n'a pu être mise en évidence dans aucun des échantillons de graine germées ou à germer aussi bien en Allemagne qu'en France. Cette difficulté analytique est probablement liée à différents facteurs (Anses, 2011):

- les graines sont généralement contaminées à de très faibles niveaux (0,1 à 1,8 CFU/g Liao and Fett, 2003),
- les graines sont généralement sèches. Les bactéries présentes à leur surface sont donc probablement dans un état de stress ou dans un état viable mais non cultivable. La survie de *E. coli* sur des graines pendant de longues durées est peu documentée (Beuchat and Scouten, 2002),
- les éventuelles bactéries présentes peuvent se retrouver à la surface mais également à l'intérieur des graines. Des études ont montré que des fissures ou des blessures des graines peuvent favoriser la pénétration des bactéries au sein des graines. Par ailleurs, des travaux destinés à évaluer la localisation de *E. coli* O157:H7 dans les graines ont été menés. Après une contamination expérimentale par inoculation directe ou par transfert direct des contaminants de la plante mère aux graines, celles-ci ont été traitées avec d'importantes concentrations de désinfectants. Les résultats ont montré que les traitements permettent une réduction du taux de contamination de seulement quelques unités logarithmiques. Ces résultats suggèrent que les bactéries sont localisées, pour une partie au moins, dans des zones protégées de la graine, l'autre partie se trouvant à la surface des graines (EFSA, 2011).

Quelles mesures de prophylaxie sont à disposition des professionnels ?

Ces deux épidémies ont révélé qu'il existe peu d'études sur les STEC associées aux végétaux en général et sur la souche *E. coli* O104:H4 en particulier (EFSA, 2011), et que des stratégies de lutte (préventives ou curatives) sont à définir hors destruction de lots potentiellement contaminés. À ce jour, les mesures de prophylaxie reposent sur un ensemble de mesures destinées à prévenir l'apparition ou la réémergence et la propagation des infections à STEC.

Méthodes préventives

Les épidémies pointant du doigt les graines germées ont été et sont à l'origine de la rédaction de différents guides destinés aux producteurs, tels que le guide de bonnes pratiques agricoles, le guide de bonnes pratiques de fabrication et le guide de bonnes pratiques d'hygiène relatif aux végétaux crus prêts à l'emploi (rédaction par le Centre technique au service de la filière fruits et légumes) en concertation avec la DGCCRF et en cours d'évaluation par l'Anses. D'autre part, depuis ces épisodes, les professionnels de la filière mettent en place des plans HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) qui peuvent être appliqués au cours de la production de graines, mais également au cours de la production de graines germées.

Néanmoins, l'application de ces règles ne suffit pas toujours à prévenir la contamination de certaines graines par des bactéries pathogènes.

Méthodes curatives

Ces méthodes sont plus spécialement destinées à éliminer les bactéries pathogènes présentes dans les aliments ou à éviter que des aliments contaminés soient consommés:

- désinfection des graines: il existe de nombreux traitements qui permettent une réduction significative (> 5 log) du nombre de bactéries pathogènes. Cependant, en dépit de considérables efforts, il n'existe, à ce jour, pas de méthode de désinfection permettant d'obtenir des graines germées indemnes de toute contamination par des bactéries pathogènes. Des traitements alternatifs (chauffage seul ou en combinaison avec d'autres traitements) pourraient améliorer l'efficacité des étapes de décontamination (EFSA, 2011),
- détection des STEC pathogènes: depuis peu (le 11 mars 2013), un critère microbiologique relatif aux STEC O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 dans les graines germées a été publié dans le journal officiel de l'Union européenne (règlement 209/2013

ayant modifié le règlement 2073/2005). Le critère est « absence dans 25 g » de produit commercialisé pendant sa durée de vie. Le protocole de détection préconisé est la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136. Cinq analyses doivent être mises en œuvre sur chaque lot commercialisé. Soulignons cependant que les plans d'échantillonnage et les prises d'essai de graines ou graines germées à analyser ne sont, à ce jour, pas définis. Il semble qu'il existe une forte hétérogénéité des bactéries pathogènes (niveau de contamination) dans les graines et les graines germées (EFSA, 2011).

Quelles mesures de surveillance ont été mises en œuvre ?

En 2011, un plan de contrôle de la qualité microbiologique des graines germées crues à consommer en l'état et des graines à germer, a été mis en place par la DGCCRF et la DGAL sur l'ensemble du territoire national. Depuis, chaque année, un plan de contrôle de la qualité microbiologique des végétaux, dont les graines germées, consommés en l'état est diligenté par les services de la DGCCRF afin d'évaluer la prévalence des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 dans ces matrices.

Utilité des travaux de recherche ?

La capacité d'un réseau de laboratoires à fournir une réponse rapide et efficace en situation d'urgence dépend des travaux de recherche menés en amont de la crise. Il s'agit en particulier du partage de méthodes, de caractérisation fine de souches et de matériaux de référence, ainsi que de la participation à des études inter-laboratoires. Les activités des laboratoires de référence européens peuvent ainsi apporter une contribution importante en se préparant à affronter une crise alimentaire comme nous l'avons connue (Caprioli *et al.*, 2012).

Conclusion

Les enquêtes épidémiologiques et microbiologiques menées lors de cette épidémie française ont montré que des graines germées contaminées par la même souche de *E. coli* O104:H4 que celle isolée en Allemagne étaient à l'origine de la contamination. Les institutions, les laboratoires ont réagi très rapidement, limitant ainsi la propagation de l'épidémie. Néanmoins, différentes questions ont été soulevées. Les scientifiques notamment cherchent à présent à y répondre.

Références bibliographiques

- Afssa (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC). <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC-Ra-STEC.pdf>.
- Anses (2011). Avis relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de SHU observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées. <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC2011sa0158.pdf>.
- Beuchat LR and Scouten AJ, 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J Appl Microbiol* 92, 382-395.
- Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P, 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol*. 2010 Sep 1;142(3):318-29.
- Caprioli A, Morabito S and De Smet K (2012). The role of European Union Reference Laboratories in food safety crisis: The experience of the EU-RL for *Escherichia coli* during the recent outbreak of *E. coli* O104:H4 infections, EuroReference, N°6.
- CDC, 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997 MMWR, 46, 741-744.
- EFSA 2011. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds, EFSA Journal 2011;9(11):2424.
- Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, Godfrey P, Haas BJ, Murphy CI, Russ C, Sykes S, Walker BJ, Wortman JR, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Bochicchio J, Chauvin S, Desmet T, Gujja

- S, McCowan C, Montmayeur A, Steelman S, Frimodt-Møller J, Petersen AM, Struve C, Krogfelt KA, Bingen E, Weill FX, Lander ES, Nusbaum C, Birren BW, Hung DT, Hanage WP, 2011. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):3065-70. doi: 10.1073/pnas.1121491109. Epub 2012 Feb 6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 3;109(14):5547.
- ISO/TS 13136. Microbiologie des aliments et aliments pour animaux — Méthode qualitative basée sur la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en temps — Réel Méthode horizontale pour la détection des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145. http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=53328.
- King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Bingen E, Mace M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noël H, Van Cauteren D, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Le Strat Y, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendredly B, Rolland P, de Valk H, 2012. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(11):1588-94.
- Liao CH and Fett WF, 2003. Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in homogenates. *Inter J Food Microbiol* 82, 245-253.
- Mariani-Kurdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX, 2011. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis*. 2011 Oct;11(10):732-3. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2011 Nov;11(11):807.
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra S, Chin CS, Ilopoulos D, Klammer A, Pemuso P, Lee L, Kisluk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyer SR, Frimodt-Moller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE and Waldor MK, 2011. Origins of the *E. coli* strain causing outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New Engl J Med*, 365, 709-717.
- Safadi RA, Abu-Ali GS, Sloup RE, Rudrik JT, Waters CM, 2012. Correlation between *In Vivo* Biofilm Formation and Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS ONE* 7(7): e41628.
- Soon JM, Seaman P, Baines RN, 2013. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Inter J Hygi Envir Health* 216 (2013):346-354.
- Watanabe Y, Ozasa K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S and Sawada T, 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect Dis*, 5, 424-428.