



Article Original

Prévalence des Gènes de Virulence d'Escherichia Coli au Cours des Gastroentérites Aigues chez les Enfants à Niamey

Prevalence of Escherichia coli virulence genes during childhood acute gastroenteritis at Niamey

Abdoulaye O¹, Abdoulaye I², Maiga DA², Kourna M³, Harouna Amadou ML², Doutchi M⁴, Bahari KD², Biraima A², Amadou O², Illa M⁵, Ousmane S⁵, Amadou S⁵, Arzika I⁵, Issa M⁶, Ouédraogo AS⁷

RÉSUMÉ

Objectif. La présente étude avait pour objectif de déterminer la prévalence des gènes de virulence d'Escherichia coli au cours des gastro-entérites aiguës chez les enfants de moins de 5 ans. **Matériels et Méthodes.** Nous avons mené une étude transversale prospective descriptive, de Novembre 2018 à Février 2019 au laboratoire de biologie de l'Hôpital National de Niamey. Ont été inclus tous les enfants de moins de 5 ans chez qui une coproculture a été réalisée. Les selles ont été ensemencées sur la gélose EMB et l'identification d'E. coli a été réalisée avec les galeries API 10 S de Biomerieux®. Une PCR en uniplexe avec les différentes amorces ciblant les gènes de virulence nous a permis de caractériser les différents pathotypes. **Résultats.** Au total, 279 patients ont été inclus. L'âge moyen des sujets était de 18,36±12,4 mois. Nous avons observé une distribution E. coli plus ou moins constante en fonction de l'âge. Nous avons détecté quatre gènes de virulence d'E. coli dans 55 échantillons des 279 patients inclus (19,7%). Les prévalences d'EPEC, d'EHEC, d'EAEC, d'EIEC étaient respectivement de 0,7%, 1,1%, 2,9% et 6,1%, tandis que celles des infections mixtes étaient de 6,8% pour EIEC+EAEC, 0,7% pour EIEC+EHEC, 0,4% pour EPEC+EIEC et 1,1% pour EPEC+EIEC+EAE. Aucune souche disposant d'ETEC et de DAEC n'a été isolée. **Conclusion.** Cette étude nous a permis d'établir la distribution des gènes de virulence d'E. coli isolés chez les enfants de moins de 5 ans au cours des gastro-entérites à l'HNN. Au regard du taux de mortalité élevé lié aux diarrhées, il est nécessaire de rendre systématique la recherche d'E coli devant toute gastro-entérite d'origine infectieuse.

ABSTRACT

Objective. The objective of our study was to determine the prevalence of Escherichia coli virulence genes during acute gastroenteritis in children less than 5 years of age. **Methodology.** We conducted a cross sectional descriptive prospective study from November 2018 to February 2019 in the biology laboratory of the Niamey National Hospital. All children aged 5 years or less who had a coproculture were included. The stool was streaked on the EMB agar and identification of E. coli was produced with API 10 S galleries in Biomerieux®. A uniplex PCR with the different primers targeting the virulence genes allowed us to characterize the different pathotypes. **Results.** A total of 279 patients were included in our study. The mean age of the cohort was 18.36 ± 12.4 months. We had observed a more or less constant distribution of E. coli according to age. We had detected four virulence genes from E. coli in 55 samples of the 279 patients included (19.7%). Prevalence of EPEC, EHEC, EAEC, EIEC were 0.7%, 1.1%, 2.9% and 6.1%, respectively, while those of mixed infections were 6, 8% for EIEC + EAEC, 0.7% for EIEC + EHEC, 0.4% for EPEC + EIEC and 1.1% for EPEC + EIEC + EAE. No strain with ETEC and DAEC had been isolated. **Conclusion.** This study allowed us to establish the distribution of E. virulence genes. E coli isolated from children less than 5 years of age during NHN gastroenteritis. In view of the high mortality rate linked to diarrhea, it is more than necessary to make the search for E coli systematic in the face of any gastroenteritis of infectious origin.

(1) Faculté de Sciences de la Santé, Université Dan Dicko DanKoulodo de Maradi, Niger.

(2) Laboratoire de Biologie, Hôpital National de Niamey, Niger.

(3) Service de Pédiatrie, Hôpital National de Niamey, Niger.

(4) Service de Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital National de Zinder, Faculté des Sciences de la Santé, Université de Zinder, Niger.

(5) Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) de Niamey, Niger.

(6) Service Biologie, Centre Hospitalier Régional de Maradi, Niger.

(7) Laboratoire de Bactériologie Virologie, CHU Sourou Sanou, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

Auteur correspondant :

Dr Ousmane ABDOULAYE

Adresse e-mail :

ousmaneabdoulaye2010@yahoo.com

Boîte postale : 465, Maradi, Niger.

Mots-clés : Gastro-entérites - E. coli - PCR uniplexe - Niger.

Keywords: Gastroenteritis - E. coli - Uniplex PCR - Niger.

INTRODUCTION

Les gastro-entérites infantiles d'origine infectieuse constituent une préoccupation de santé publique liées sans doute à la présence de certaines bactéries pathogènes particulièrement la tribu d' E coli [1, 2].

Ce sont des bactéries normalement présentes dans la flore digestive de l'Homme et des animaux à sang chaud. Certaines souches d'E. coli sont pathogènes car elles ont acquis des facteurs de virulence [3]. Elles sont associées à des risques élevés de morbi-mortalité chez les nourrissons

de moins de 5 ans particulièrement dans les pays en voie de développement [4].

Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches d'E. coli pathogènes sont regroupées en pathotypes différentes par la présence de gènes de virulence avec [5, 6, 7]:

- Les E. coli entérotoxigènes (ETEC) qui sont la cause majeure des diarrhées aqueuses aiguës chez les enfants de moins de 3 ans dans les pays en voie de développement et sont également responsables de la « diarrhée du voyageur » ou « turista »;

- Les E. coli entéroinvasives (EIEC) qui sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus) ;

- Les E. coli entéroaggrégatives (EAEC) qui sont de plus en plus souvent incriminées dans des cas de diarrhée persistante, chez l'enfant comme chez l'adulte, dans les pays en voie de développement mais aussi dans les pays industrialisés ;

- Les E. coli à adhérence diffuse (DAEC) qui sont responsables de diarrhée, en particulier chez les enfants de plus de 12 mois ;

- Les E. coli entérohémorragiques (EHEC) qui se caractérisent par la production de toxines dénommées toxines Stx (pour « Shiga-like toxin »). Elles sont responsables de troubles variés allant de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique pouvant évoluer vers un Syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez

l'enfant ou une Microangiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte ;

- Les E. coli entérotoxigènes (EPEC) sont responsables de diarrhée sévère, principalement chez les enfants de moins de 12 mois dans les pays en voie de développement.

Au Niger, très peu d'études sur le rôle des pathotypes d'E. coli dans les diarrhées avaient été menées. C'est pourquoi, notre travail avait pour objectif de déterminer la prévalence des gènes de virulence d'E. coli responsables des diarrhées isolées chez les enfants de moins de 5 ans admis à l'Hôpital National de Niamey pour gastro-entérites aiguës.

MÉTHODES

Nous avons mené une étude transversale prospective descriptive, de Novembre 2018 à Février 2019.

Notre population d'étude était constituée d'enfants de moins de 5 ans chez qui une coproculture a été réalisée au laboratoire de biologie de l'Hôpital National de Niamey.

Les données épidémiologiques ont été récoltées sur les registres du laboratoire.

Les souches d'E. coli avaient été isolées sur le milieu EMB à partir des selles diarrhéiques puis incubé à 37°C pendant 24h. L'identification avait été réalisée grâce aux mini galeries API 10 S de Biomérieux®.

La caractérisation des gènes de virulence a été réalisée par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) avec des amorces spécifiques pour chaque gène recherché (tableau I) à l'unité de bactériologie-virologie du Centre National de Recherche Médicale et sanitaire (CERMES) de Niamey.

Tableau I : Récapitulatif des gènes recherchés par pathotype d'E. coli par PCR

E. coli	Gene recherché	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation	Concentration gel d'agarose	Témoin positif
EPEC	<i>bfp</i>	324 bp	57°C	2%	E238-69
	<i>eae</i>	494 bp	65°C	2%	E238-69
EIEC	<i>ipaH</i>	424 bp	53°C	2%	M90T
EAEC	<i>aggR</i>	630 bp	53°C	2%	17.2
EHEC	SLT I	130 bp	56°C	3%	EDL 933
	SLT II	346 bp	56°C	2%	EDL 933
ETEC	LT	707 bp	56°C	2%	EDL 1493
EPEC: <i>E. coli</i> entérotoxigènes.		EIEC: <i>E. coli</i> entéroinvasives		EAEC: <i>E. coli</i> Enteroaggrégatives	
EHEC: <i>E. coli</i> entérohémorragiques		ETEC: <i>E. coli</i> entérotoxigènes			

La séparation des produits de la PCR, les électrophorèses et la visualisation des bandes ont été réalisées conformément aux instructions des fabricants des Kits. La figure 1 présente un exemplaire des résultats obtenus.

Le protocole de cette étude a eu l'autorisation de la direction générale de l'Hôpital National de Niamey.



RÉSULTATS

Caractéristiques de la population d'étude

A l'issue de ce travail, 279 enfants âgés de moins de 5 ans tous sexes confondus et de provenance diverses de la ville de Niamey et de ses environs ont été inclus.

Parmi les enfants inclus dans l'étude, 77,1 % avaient moins de 24 mois. L'âge moyen était de 18,36 ± 12,4 mois.

Sur les 279 enfants inclus dans cette étude, 106 (38%) étaient de sexe féminin, et 173 (62%) de sexe masculin (tableau II).

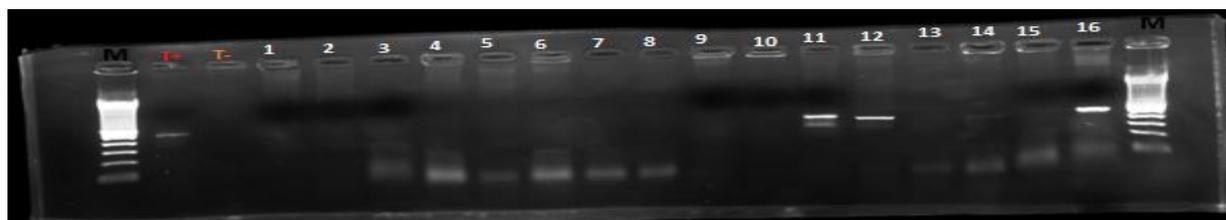


Figure 1 : Gel après migration de gène de virulence eae.

Taille attendue 494 pdb. M: marqueur de taille, T+: témoin positif, T-: témoin négatif. Les échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 et 15 sont négatifs. Les échantillons 11, 12, 14 et 16 sont positifs.

Données biologiques

Les bactéries pathogènes identifiées étaient isolées chez 92/279(32,9%) patients. Il s'agissait d'E. coli dans 98% des cas et de Salmonelle Spp dans 2 % des cas.

Sur les 279 prélèvements nous avons isolé et identifié 90 souches d'E. coli dont 55 seulement présentaient des gènes de virulence (61,1%).

Les prévalences d'EPEC, d'EHEC, d'EAEC, d'EIEC étaient respectivement de 0,7%, 1,1%, 2,9% et 6,1%, tandis que celles des infections mixtes étaient de 6,8% pour EIEC+EAEC, 0,7% pour EIEC+EHEC, 0,4% pour EPEC+EIEC et 1,1% pour EPEC+EIEC+EAE. Aucune

souche ETEC et DAEC n'avaient été isolée. Les données sont résumées dans le tableau III.

Tableau II : Résultats de la Recherche des souches d'E coli en fonction de l'âge et du sexe

Tranche d'âge	Recherche des souches d' E coli			
	Négative		Positive	
	Sexe			
	M	F	M	F
0 à 12 mois	54	25	21	21
13 à 24 mois	37	26	22	9
25 à 59 mois	28	19	11	6
M: Masculin				
F: Féminin				

Tableau III : Distribution des gènes de virulence

Pathotypes	Nombre	% chez les E coli (n=90)	% chez les enfants (n=279)
ETEC	0	0.0	0.0
DAEC	0	0.0	0.0
EAEC	8	8.9	2.9
EHEC	3	3.3	1.1
EIEC	17	18.9	6.1
EPEC	2	2.2	0.7
EIEC+EAEC	19	21.1	6.8
EIEC+EHEC	2	2.2	0.7
EPEC+EIEC	1	1.1	0.4
EPEC+EIEC+EAEC	3	3.3	1.1
ETEC: <i>E. coli</i> entérotoxigènes		DAEC: <i>E. coli</i> à adhérence diffuse	
EAEC: <i>E. coli</i> Enteroaggregatives		EHEC: <i>E. coli</i> entérohémorragiques	
EIEC: <i>E. coli</i> entéroinvasives		EPEC: <i>E. coli</i> entéro-pathogènes	

DISCUSSION

Le profil des bactéries responsables des gastro-entérites chez les enfants est une information indispensable pour orienter l'antibiothérapie curative particulièrement lorsqu'il s'agit de la tribu des E coli. Dans notre étude, sur 279 prélèvements analysés, nous avons identifiés 55 souches d'E coli présentant des gènes de virulence soit 19,7%. Cette prévalence obtenue était plus proche de celles rapportées par Moyo en Tanzanie en 2006 (22,9%) [8], Dias au Brésil en 2016, (18 %) [9] dans des études similaires. Par contre, des taux plus élevés avaient été retrouvés par l'équipe de Bonkoungou au Burkina Faso en en 2012 (45%) [10], Nweze (44,74%) et Okeke (37.1%) au Nigeria respectivement 2000 et en 2010 [11, 12], Yoshio Iijima au Kenya en 2009 (55,9%) [13], Paola Rappelli au Mozambique en 1999 (41,8%) [14].

Somda et ses collaborateurs avaient retrouvé une prévalence de 8,7% chez les enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso en 2017 [15]. Cette différence pourrait s'expliquer par les campagnes de sensibilisation sur l'allaitement maternel exclusif, l'amélioration des conditions d'hygiène des populations notamment l'augmentation de l'approvisionnement en eau potable, le lavage ou désinfection systématique des mains intervenu suite à l'épidémie d'Ebola en Afrique de l'Ouest [15].

Dans notre étude, nous avons détecté plusieurs pathotypes d'E. coli diarrhéiques. E. coli entéroinvasive (EIEC) était le pathotype le plus fréquent avec 6,1%. Nos résultats présentent des différences par rapport à ceux obtenus par plusieurs auteurs et ces différences pouvait être expliqué par le fait que ce pathotype variait semblablement d'une zone géographique à une autre [12, 15, 16, 17, 18]. Cependant, Moyo et al avaient rapporté une prévalence nulle d'EIEC

dans une étude similaire réalisée à Dar es Salam en Tanzania, en 2006 [8].

Dans la présente étude le pathotype *E. coli* Enteroaggregative (EAEC) avait été isolé chez 8 patients soit 2,9%. Ces résultats étaient comparables avec ceux obtenus dans des études réalisées au Burkina Faso [10, 15], au Nigeria [11, 12], en Tunisie [16] en Afrique australe en Tanzanie [8] et au Kenya [13, 18] mais aussi en Inde et au Vietnam où ce pathotype prédominait dans les diarrhées chez les enfants [17, 19]. En effet, le pathotype EAEC était souvent incriminée dans des cas de diarrhée persistante, chez l'enfant comme chez l'adulte et la présence de trois gènes de virulence est nécessaire pour l'expression du pouvoir pathogène [20]. Sa diffusion serait liée aux mauvaises pratiques d'hygiène. Selon certains auteurs, une carence en zinc pouvait entraîner l'expression de ses gènes de virulence [21].

Dans notre travail, *E. coli* entérohémorragique (EHEC) avait été isolé chez 3 patients soit 1,1%. Ces chiffres étaient semblables à ceux rapportés dans études réalisées au Nigeria et en Tunisie [11, 12, 16]. Par contre, des fréquences relativement plus élevés étaient rapportées par Priya Rajendran en Inde en 2010 [17]. Ailleurs, en Afrique australe, Rappeli, Moyo et Nyanga avaient noté une absence totale de ce pathotype (0%) dans leurs travaux réalisés respectivement au Mozambique en 2005 [14], en Tanzanie en 2007 [8] et au Kenya en 2016 [18]. En effet, les souches EHEC étaient surtout retrouvées dans l'environnement, particulièrement chez les bovins qui constituent le réservoir naturel. L'homme se contamine par l'intermédiaire des aliments [22].

Dans notre série, nous avons détecté deux patients porteurs du pathotype EPEC, soit 0,7%. Il s'agissait des *E. coli* responsables de diarrhée sévère, principalement chez les nourrissons de moins de 12 mois dans les pays en voie de développement [3]. Ce taux faible rejoignait celui rapporté par Somda et al au Burkina Faso en 2017 [15]. Par contre, plusieurs auteurs avaient relevé des taux nettement supérieurs dans leurs séries [8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19]. Au Kenya, Nyanga avait liées cette augmentation au taux d'isolement [18].

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé des souches d'*E. coli* comportant les gènes spécifiques d'ETEC et DAEC. Par contre Bonkougou et al avaient noté la présence d'ETEC dans leurs études chez les enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso [10]. C'est aussi le cas des conclusions de plusieurs études réalisées en d'Afrique subsaharienne qui avaient retrouvé des prévalences non négligeables [8, 12, 16, 18].

Dans notre série, nous avons également rencontré des souches comportant des combinaisons de 2 gènes de virulence chez 22 patients avec 6,8% pour EIEC+EAEC, 0,7% pour EIEC+EHEC, 0,4% pour EPEC+EIEC et des combinaisons de 3 gènes avec 1,1% EPEC+EIEC+EAEC. Ces variantes de combinaisons mixtes de 2 ou 3 gènes de virulence avaient été également rapportées par d'autres études avec des prévalences comparables [8, 10, 15, 16, 19].

CONCLUSION

Les pathotypes d'*E. coli* hébergeant des gènes virulents sont des causes importantes de diarrhée chez les enfants de

moins de 5 ans. Il est nécessaire d'évaluer le comportement de ces souches vis-à-vis des antibiotiques et mieux de conduire ce type d'étude sur une année complète dans le but d'évaluer l'impact des saisons sur la distribution des pathotypes d'*E. coli*.

RÉFÉRENCES

1. Titilawo Y, Obi L, Okoh A. Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiology*. 2015; 15(204):1-14
2. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, for the Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. Sestak K, éditeur. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e72788.
3. Brugère H, Auvray F, Mariani-Kurkdjian P, King L A, Loukiadis E. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 50/Spécial Risques alimentaires microbiologiques*, P23-28
4. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*. 2015;385(9966):430-40.
5. Vidal M, Kruger E, Duran C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(10):5362-5.
6. German P Y, Bouguenec CL. Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'homme. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008; (398):67-76.
7. Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S. Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entérohémorragique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2016 ;(486):45-52.
8. Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 7(1)92
9. Dias R.C., Dos Santos B.C., Dos Santos L.F., Vieira M.A., Yamatogi R.S., Mondelli A.L., Sadatsune T., Sforcin J.M., Gomes T.A., Hernandez R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *APMIS*. 2016;124(4):299-308.
10. Bonkougou IJO, Lienemann T, Martikainen O, Dembelé R, Sanou I, Traoré AS, Siitonen A, Barro N, Haukka K. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in children with and without diarrhoea in Burkina Faso. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(9):901-6.
11. Okeke IN, Lamikanra A, Ck HS, Kaper JB. Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Childhood Diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol*. 2000;38:6.
12. Nweze E. Aetiology of Diarrhoea and Virulence Properties of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* among Patients and Healthy Subjects in Southeast Nigeria.

- Journal of Health, Population and Nutrition. 2010; 28(3): 245-252.
13. Iijima Y, Oundo JO, Hibino T, Saidi SM, Hinenoya A, Osawa K, Shirakawa T, Osawa R, Yamasaki S. High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2017;70(1):80-3.
 14. Rappelli P, Folgosa E, Solinas ML, DaCosta JL, Pisanu C, Sidat M, Melo J, Cappuccinelli P, Colombo MM. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2005;43(1):67-72.
 15. Somda NS, Bonkougou OJI, Zongo C, Kpoda DS, Tapsoba F, Bassolé IHN, Traoré Y, Savadogo A. Prevalence of *Escherichia coli* virulence genes in patients with diarrhoea in Ouagadougou, Burkina Faso. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2017; 18(4):179.
 16. Nejma IBS-B, Zaafrane MH, Sdiri-Loulizi K, Said MB, Aouni M. Etiology of Acute Diarrhea in Tunisian Children with Emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Identification of *E. coli* Virulence Markers. 2014;43:14.
 17. Rajendran P, Ajjampur SSR, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, Samuel P, Deva Prasanna Rajan DP, Kang G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;68(2):117-22.
 18. Nyanga PL, Onyuka J, Webale MK, Were T, Budambula V. *Escherichia coli* pathotypes and *Shigella* sero-groups in diarrheic children in Nairobi city, Kenya. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017;10(3):220-228.
 19. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(2):755-60.
 20. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(5):2138-40.
 21. Medeiros P, Bolick DT, Roche JK, Noronha F, Pinheiro C, Kolling GL, Lima A, Guarrant RL. The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence*. 2013;4(7):624-33.
 22. Beutin L, Fach P. Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing. *Microbiology Spectrum*. 2014; 2(3).EHEC-0001-2013.