

ÉPIDÉMIOLOGIE DES *ESCHERICHIA COLI* VÉROCYTOTOXIQUES ET ALIMENTATION

Leclerc V.¹, Le Querrec F.², Andral B.³, Vernozy-Rozand C.¹

1- AFSSA-Lerhqa, unité microbiologie des aliments et écologie microbienne, Maisons-Alfort

2- Direction Générale de l'Alimentation, Bureau de la surveillance des denrées alimentaires, Paris

3- AFSSA-Lyon, unité hygiène et sécurité des viandes de ruminants, Lyon

4- Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, unité microbiologie alimentaire et prévisionnelle, Marcy l'étoile

Introduction

Escherichia coli est un hôte normal du tube digestif des espèces à sang chaud. Ainsi, chez l'homme, ces bactéries représentent une part importante de la flore intestinale. La majorité de ces bactéries ne sont pas pathogènes, toutefois, certaines d'entre elles peuvent le devenir lorsqu'elles ont la capacité de produire des vérotoxines (appelées également shigatoxines). Dans ce cas, ces *E. coli* sont appelés VTEC ou STEC (Vero Toxin ou Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*). Parmi tous ces VTEC, *E. coli* O157 : H7 (séro groupe O157) joue un rôle important puisque c'est le sérotype le plus fréquemment retrouvé en Europe et au niveau international. Toutefois, de nombreux autres sérogroupes font également partie du groupe des VTEC.

tées ou déformées appelées schizocytes) et d'une thrombopénie (diminution des plaquettes sanguines). L'hospitalisation sera toujours nécessaire et une dialyse devra être réalisée pour environ la moitié des malades. Le taux de mortalité associé au SHU est de 2 à 5% (jusqu'à 50% dans le cas de certaines épidémies). Des séquelles à titre d'insuffisance rénale chronique, de lésions neurologiques ou encore d'hypertension artérielle peuvent également survenir.

PTT : il est associé aux *E. coli* O157 : H7. Typiquement, la maladie associe une anémie hémolytique mécanique avec schizocytose, une thrombopénie, de la fièvre, des signes neurologiques labiles et une insuffisance rénale. Le PTT est très voisin du SHU décrit chez l'enfant. Il est cependant beaucoup plus rare chez l'adulte que chez l'enfant, avec un pronostic plus défavorable chez l'adulte. Lorsque la guérison est acquise, elle est le plus souvent définitive.

Surveillance en santé humaine

En France, l'incidence des VTEC sur la santé humaine est appréciée indirectement à partir de la surveillance des cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans⁽¹⁾. Le SHU est, en effet, la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant âgé de 1 mois à 3 ans et souvent la conséquence d'une infection par des VTEC. Ce système de surveillance repose sur un réseau de 31 services de néphrologie pédiatrique. Ces services sont volontaires et répartis sur toute la France. Ce réseau, coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), existe depuis 1996. Les données recueillies permettent de suivre les tendances spatio-temporelles des cas de SHU, de décrire les caractéristiques des personnes malades (répartition par âge, sexe et description clinique), de déterminer les agents responsables et, enfin, de détecter les phénomènes épidémiques.

Afin de déterminer les agents responsables, deux prélèvements de sérum seront réalisés chez les malades (à J0 et J15) et testés par l'unité des Entérobactéries de l'Institut Pasteur (26 sérogroupes testés). En France, le séro groupe O157 est fréquemment retrouvé (environ 50% des cas de SHU investigués). Cependant, il exis-

Période d'étude	Matrices testées	Nombre éch.	Méthodes utilisées	Résultats obtenus
Juin 1995	Fromages lait cru (chèvre, vache)	140	- VIDAS	- Absence
Février à avril 1997	Steaks hachés réfrigérés	90	- VIDAS et Pétrifilm - PCR (<i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>ehly</i>)	- 8 <i>E. coli</i> O157 : H7 (<i>stx2+</i> , <i>eae+</i> , <i>ehly+</i>)
Novembre 1997 à février 1998	Steaks hachés réfrigérés	504	- DYNAL ou VIDAS-ICE ou BAM -PCR (<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>ehly</i> , <i>CNF</i> , <i>Kat</i> , <i>EAF</i> et <i>Eagg</i>)	- Absence
	Coquillages vivants (huîtres, moules)	160		- 1 <i>E. coli</i> O157 (sans facteurs de virulence)
	Fromages lait cru (vache, chèvre, brebis)	519		- 14 souches O157 (7 <i>E. coli</i>) (sans facteurs de virulence)
Janvier à décembre 1999	Steaks hachés réfrigérés	3450	- VIDAS	- 4 <i>E. coli</i> O157 : H7 (<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae+</i> , <i>ehx+</i>)

Tableau 1 : Résultats des études concernant la recherche des *E. coli* O157

Le mode de contamination le plus fréquent est l'ingestion via l'aliment et, depuis le début des années 80, *E. coli* O157 : H7 a été responsable d'épidémies de grande ampleur associées à une forte létalité. En France, les cas sont majoritairement sporadiques et l'incidence des VTEC sur la santé humaine est évaluée à travers la surveillance du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez les enfants de moins de 15 ans. Parallèlement à la surveillance de ces cas humains, il existe depuis plusieurs années une surveillance de l'amont (aliment, animal et environnement).

Maladie associée chez l'homme

L'infection peut être asymptomatique mais, des symptômes graves tels que diarrhées aqueuses et/ou sanglantes, un syndrome hémolytique et urémique ou un purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) peuvent également être associés.

Diarrhées : ce sont les formes les plus courantes de ces affections humaines (les formes aqueuses, moins graves, sont d'ailleurs probablement sous-estimées). Les sérotypes responsables des diarrhées hémorragiques appartiennent tous au groupe des EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*) et *E. coli* O157 : H7 est souvent retrouvé. Quelques jours après l'ingestion de ces pathogènes, des douleurs abdominales et des diarrhées aqueuses peuvent se produire. Une partie de ces malades développe des diarrhées sanglantes intenses qui peuvent durer de 2 à 4 jours (jusqu'à une dizaine de selles de sang par jour) et nécessitent souvent une phase d'hospitalisation. Cependant, dans environ 90% des cas, le patient guérit sans séquelles.

SHU : dans 3 à 10% des cas, les patients - le plus souvent des enfants - développent un SHU. Il s'agit d'une insuffisance rénale aiguë accompagnée d'une anémie hémolytique de type micro angiopathique (définie par une hémolyse intravasculaire avec haptoglobine plasmatique élevée et un pourcentage anormal d'hématies fragmen-

te d'autres sérogroupes également associés à ces infections (O115, O26, O9...). Par ailleurs, on constate que la proportion de cas avec une réponse sérologique positive est en constante diminution depuis 1996. Ce phénomène pourrait s'expliquer soit par l'absence de réponse immunologique du patient, soit par l'émergence de nouveaux sérogroupes non inclus dans le sérodiagnostic pratiqué. Les cas de SHU détectés en France sont majoritairement sporadiques et ne concernent qu'un petit nombre de cas groupés. A ce jour, aucun aliment n'a pu être clairement identifié comme étant à l'origine de ces cas de SHU.

Pour les années 1993 à 1999, l'incidence moyenne annuelle des cas de SHU varie de 0,51 à 0,89 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans. Cependant, même si le nombre de cas de SHU est stable au cours des ans, le nombre d'infections à VTEC est sous-estimé. En effet, toutes les infections n'évoluent pas vers un SHU et les diarrhées sévères (ou non) ne sont quasiment jamais investiguées. Toutefois, à ce jour et en France, c'est le seul système mis en place en terme de surveillance de l'impact des VTEC sur la santé humaine.

La situation épidémiologique française (*E. coli* O157 : H7 responsable d'environ 50% des cas de SHU et absence de grandes épidémies) est globalement proche de celle retrouvée chez la plupart de nos voisins européens. Elle est, en revanche, différente de celle retrouvée au Royaume-Uni, aux Etats-Unis, au Canada et au Japon. Dans ces pays, la quasi totalité des souches impliquées dans les infections sont des *E. coli* du séro groupe O157 (proche de 100%). De plus, des épidémies impliquant un nombre élevé de malades se sont déjà souvent produites.

Recherche dans les aliments

Si certaines contaminations peuvent être dues aux contacts inter-humains (en alimentation depuis quelques années) ou homme-animal, la principale voie de conta-

Période d'étude	Matrices testées	Nombre éch.	Méthodes utilisées	Résultats obtenus
Janvier 98 à juin 2001	Carcasses et découpes de porc (couenne et viande), fécès de porc, environnement des abattoirs et ateliers de découpe de porc	4469	- PCR (<i>stx</i> en général)	- Bouillons <i>stx</i> + : 16% - 116 souches VTEC (dont 1 VTEC O55) dont 1 souche potentiellement pathogène (<i>stx1</i> -, <i>stx2</i> +, <i>stx2e</i> +, <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +, <i>uidA</i> -)
Août à novembre 2000	Fromages lait cru (vache, chèvre, brebis)	414	- Sérotypage (O26, O55, O103, O111, O157)	- Bouillons <i>stx</i> + : 11% - 2 souches VTEC (sérotypes non déterminés) potentiellement pathogènes (<i>stx</i> +, <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +)
Janvier à avril 2001		625	- PCR (facteurs de virulence spécifiques)	- Bouillons <i>stx</i> + : 15% - 3 souches VTEC (sérotypes non déterminés)
Avril à septembre 2001	Effluents d'élevage (fécès, lisiers, fumiers d'élevages bovins et porcins) et boues de stations d'épuration	988		- Bouillons <i>stx</i> + : 21% - 23 souches VTEC (1 O26, 1 O55, 1 O157 : H7, 2 O103) - 5 souches potentiellement pathogènes (<i>stx</i> +, <i>eae</i> +, <i>ehx</i> +)

Tableau 2 : Résultats des études concernant la recherche des VTEC

mination reste l'aliment. Dans ce contexte, de nombreuses matrices sont susceptibles d'être contaminées (contaminations croisées entre les fécès des animaux et la carcasse ou le lait, aliments en contact avec la terre ou l'eau contaminée). Par exemple, depuis 1982 et au niveau international, de nombreux aliments ont été impliqués dans des épidémies dues à *E. coli* O157 : H7. Ces aliments sont d'origine animale (bœuf, salami, mayonnaise, lait cru...) ou végétale (jus de pomme, laitue, pomme de terre, radis...). L'eau de boisson peut également être contaminée. Ainsi, parallèlement à la surveillance des cas humains, la recherche d'*E. coli* O157 : H7 (et plus récemment, de façon moins restrictive, de VTEC) dans les aliments est également réalisée depuis plusieurs années.

En dehors du cadre des investigations réalisées lors d'une épidémie, la recherche de ces pathogènes peut également être effectuée. Toutefois, en ce qui concerne la recherche des VTEC (ou plus spécialement des *E. coli* O157 : H7) dans les aliments, chez les animaux ou dans l'environnement, la récolte des données est difficile. En effet, mis à part pour les produits laitiers⁽²⁾, il n'existe pas actuellement de réglementation imposant la recherche d'*E. coli* pathogènes dans les aliments. Cependant, dans le cadre des auto-contrôles réalisés, il est nécessaire de déclarer tout résultat (par exemple, présence d'*E. coli* O157 : H7) susceptible de présenter un risque pour la santé publique.

La Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) joue un rôle important dans la mise en place et le suivi d'une surveillance dans les aliments. Ainsi, en France depuis 1995, la DGAI a initié plusieurs plans de surveillance⁽³⁾ au niveau départemental ou national. Des études de prévalence dans les aliments ont également été réalisées sous la forme de projets ponctuels. L'unité de microbiologie des aliments et écologie microbienne ainsi que l'atelier de biotechnologie de l'AFSSA, plusieurs laboratoires vétérinaires départementaux, l'unité de microbiologie alimentaire et prévisionnelle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et l'Institut Pasteur de Paris ont été impliqués dans le cadre de ces travaux. Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Dans le tableau 1, les pathogènes recherchés sont les *E. coli* O157. Dans ce cas, diverses méthodes microbiologiques basées sur la recherche de la bactérie ont été mises en œuvre (Vidas, Vidas-ICE, Pétrifilm, Dynal ou BAM). En complément, et à partir des souches isolées, des méthodes de biologie moléculaire (PCR) ont été utilisées pour rechercher la présence de certains facteurs de virulence spécifiques pouvant être associés à ces souches : *stx1*, *stx2* (shigatoxines 1 et 2), *eae* (intimine), *ehly* (entérohémolysine), *CNF* (Cytotoxic Necrotizing Factor), *Kat* (catalase-peroxydase), *EAF* (entero-adherent factor) et *Eagg* (entero-aggregant factor). Ces facteurs de virulence peuvent rendre les *E. coli* O157 potentiellement pathogènes. Cependant, tous les *E. coli* O157 ne possèdent pas ces facteurs de virulence.

Dans le tableau 2, les pathogènes recherchés sont élargis au groupe des VTEC (tous les *E. coli* producteurs de vérotoxines ne sont pas des *E. coli* O157. Il existe également d'autres sérogroupes). Dans ce cas, les méthodes utilisées ne sont plus issues de normes ou de méthodes microbiologiques validées mais de méthodes de biologie moléculaires développées au sein des laboratoires. Ces méthodes permettent de répondre à la question présence ou absence de VTEC et peuvent être complétées par une approche sérologique permettant d'identifier le sérotype isolé. Dans le cas des études décrites dans ce tableau, 5 sérogroupes ont été testés (O26, O55, O103, O111 et O157). Les techniques de sérologie sont mises en place à partir de souches isolées. En revanche, les techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées soit à partir de l'échantillon mis en culture (recherche des shigatoxines en général : *stx*) soit à partir de la souche isolée (recherche des facteurs de virulence spécifiques : *stx1*, *stx2*, *eae*...).

Études réalisées en abattoir

En complément des études portant sur les aliments et l'environnement, divers travaux ponctuels ont également été réalisés. Par exemple, depuis 1998, l'unité hygiène et sécurité des viandes de ruminants (Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Bovine et Hygiène des Viandes de l'AFSSA) s'intéresse au portage de ces germes par les bovins arrivant à l'abattoir et au risque de contamination de l'environnement industriel. Les prélèvements concernent les carcasses, les matières fécales, mais surtout les oreilles des bovins et les écouvillonnages de surfaces en abattoir. Les analyses bactériologiques ont été réalisées en utilisant des méthodes d'immuno-concentration (VIDAS ICE) puis en caractérisant les souches isolées (milieux chromogènes, VIDAS Eco, agglutination O157 et H7). Enfin, certains facteurs de virulence associés aux souches isolées ont été recherchés par PCR.

Ainsi, 13,6% des oreilles de bovins prélevées à l'abattoir permettent l'isolement d'*E. coli* O157 : H7 et, plus du quart d'entre elles (soit 3,6% des oreilles prélevées) sont porteuses de souches vérocytotoxiques. Ces dernières ont toutes le même profil pour ce qui concerne les facteurs de virulence (*stx* 2 +, *eae* +, *ehly* +).

De plus, 8% des prélèvements de surfaces sont contaminés par des souches d'*E. coli* O157 : H7. La moitié d'entre eux concerne des souches vérocytotoxiques qui, pour les chaînes " bovins ", présentent un profil de virulence identique à celui des souches isolées sur les animaux. Les surfaces en cause sont en particulier les gouttières d'éviscération, les plates-formes ou encore les scies de fente. A la vue de ces données, il importe de rappeler l'importance du respect des règles d'hygiène en abattoir, en particulier pour la procédure d'habillage, la ligature du rectum et l'ensachage des oreilles.

Enfin, 58 souches d'*E. coli* O157 (dont 24 souches vérocytotoxiques) ont fait l'objet d'une étude concernant leur résistance aux antibiotiques. Ces souches montraient une parfaite sensibilité aux antibiotiques testés. Des résultats similaires ont également été obtenus par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon dans le cadre de l'étude dans les abattoirs/ateliers de découpe de porc.

Harmonisation et qualité des données récoltées

Les données obtenues à partir des différentes études ne sont pas harmonisées. Elles ne sont donc pas forcément comparables entre elles et utilisables en l'état pour des objectifs autres que ceux de l'étude initiale. Ainsi, des facteurs tels que l'échantillonnage (nombre d'échantillons testés, classes réalisées, période de prélèvement...) ou les méthodes de détection utilisées peuvent induire un biais important lors de l'utilisation des données brutes. De la même façon, les informations récoltées en terme de facteurs de virulence associés au pathogène ne sont pas toujours très claires. A ce sujet l'AFSSA a récemment fait l'objet, par ses trois ministères de tutelle, d'une saisine portant sur les caractéristiques à retenir pour considérer qu'une souche d'*E. coli* vérocytotoxique est potentiellement pathogène pour l'homme. Les conclusions validées par le Comité d'Experts Spécialisés microbiologie ont servi à la rédaction de l'avis de l'AFSSA rendu le 28 novembre 2001.

Perspectives européennes

Divers actions sont également entreprises sur le plan européen. Il peut s'agir de :
- projets de recherche spécifiques ayant pour but d'acquérir une information nouvelle (physiologie des VTEC, survie dans l'environnement, études de prévalence dans certaines niches écologiques, recherche des facteurs de virulence, etc.).
- groupes de travail tel que celui consacré aux VTEC dans le cadre du Food Law Enforcement Practitioners. Ce groupe permet d'échanger des informations sur la situation épidémiologique des pays participants, les systèmes de surveillance, les

options de gestion, les actions de communication et de formation relatives au risque VTEC. La France participe depuis 5 ans aux réunions bi-annuelles de ce groupe de travail du FLEP.

- audits au plan européen. Ainsi, l'Office Alimentaire et Vétérinaire a effectué une série de missions dans six états membres entre janvier et juin 2001. L'objectif de ces visites était de mettre en avant les meilleures pratiques relatives au fonctionnement des contrôles sur les *E. coli* vérocytotoxiques dans la chaîne de production de denrées alimentaires.

- la rédaction de méthodes standardisées. A ce titre, la norme EN ISO 16 654(4) a été publiée en juillet 2001. Cette norme concerne la recherche des *E. coli* O157 : H7 dans les matrices alimentaires et représente, à ce jour, la méthode de référence au niveau européen.

- la mise en commun des informations disponibles au niveau des différents pays européens. Cette collaboration permet de détecter rapidement les épidémies et de limiter l'exposition au danger (communication entre pays). Le réseau européen Enter-net peut permettre d'atteindre ces objectifs.

Conclusions et perspectives

De nombreuses connaissances ont été acquises sur les VTEC ces dernières années (réservoirs, voies de contamination, produits sensibles et pratiques à risque, physiologie et survie du pathogène suite à un stress...) et ont permis d'améliorer la surveillance de ces pathogènes. Pour autant, ces informations doivent être complétées. Au delà de l'amélioration des outils de surveillance en terme de santé humaine (étude des facteurs de risque de survenue du SHU chez les enfants de moins de 15 ans, investigation des diarrhées sévères, diagnostic sérologique de nouveaux

sérogroupe), la réflexion doit également porter en amont de l'infection humaine. Cette démarche nécessite d'optimiser la méthodologie de détection des VTEC (*E. coli* O157 : H7, autres VTEC, prise en compte spécifique des phénomènes de stress bactérien afin de limiter la sous-estimation tant qualitative que quantitative). Enfin, sans être exhaustif, il serait également intéressant d'étudier l'impact de divers stress sur la capacité de survie dans l'environnement (meilleure connaissance des voies de contamination) et sur la capacité de virulence de ces pathogènes. Ces informations permettraient d'apporter des données actualisées et pertinentes pour l'évaluation du risque VTEC qui vient d'être initiée (définition d'un profil de risque) dans le cadre des travaux du 34^{ème} Comité du Codex Alimentarius (Bangkok, Thaïlande, octobre 2001).

Références :

- (1) Haeghebaert S, Vaillant V, Bouvet P, Grimont F, et le réseau de néphrologues pédiatres, 2001. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 1999. Bulletin épidémiologique hebdomadaire n°37.
- (2) Directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait.
- (3) Notes de service DGAL/SDHA/N1997-n°8168 du 24 octobre 1997 et DGAL/SDHA/N2000-n°8102 du 9 août 2000.
- (4) Norme EN ISO 16 654 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *E. coli* O157 (juillet 2001).