

Maisons-Alfort, 6 juin 2010

**Note succincte
de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
et du Laboratoire national de référence pour les STEC**

**accompagnant l'avis de l'AFSSA du 27 mai 2010
relatif à la définition des souches STEC pathogènes d'*Escherichia coli* producteurs de shiga-
toxines, dans le cadre de l'épidémie actuelle observée en Allemagne**

Contexte épidémiologique

Depuis début mai 2011, une incidence accrue des cas de syndromes hémolytiques et urémique (SHU) et de diarrhées hémorragiques liés à des infections dues à des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) a été observée en Allemagne, la plupart de ces cas étant apparus dans les régions du nord du pays. Les cas relevés dans d'autres pays européens concernaient des personnes ayant voyagé dans ces régions. Les premiers résultats de l'étude rétrospective menée à Hambourg suggèrent un lien entre la maladie et la consommation de tomates, de concombres et de salade verte crus¹.

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) désigne une complication grave, parfois mortelle, qui survient dans des infections intestinales bactériennes à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (syn. vérotoxines) (STEC/VTEC). Le tableau clinique complet du SHU se caractérise par une insuffisance rénale aiguë, une anémie hémolytique et une thrombocytopenie. Ces symptômes sont généralement précédés de diarrhées, souvent hémorragiques. La souche épidémique qui a été isolée chez plusieurs patients en Allemagne est une souche d'*E. coli* sérotype O104:H4 productrice de Shiga-toxine 2.

Le nombre important de personnes subitement atteintes, la distribution géographique et démographique des cas ainsi que les premiers entretiens avec les patients ont suggéré que des aliments contaminés par des STEC seraient à l'origine de la transmission de l'infection. Des aliments tels que le lait cru et la viande crue, qui avaient été identifiés en tant que sources de contamination lors de précédentes épidémies dues aux STEC, ne semblent pas être impliqués dans les circonstances actuelles. Les résultats préliminaires d'une étude cas-témoins menée par l'institut Robert Koch (RKI) et les autorités sanitaires de Hambourg démontrent un lien significatif entre la maladie et la consommation de tomates, de concombres et de salade verte crus.

Existe-t-il une définition des souches pathogènes d'*E. coli* humaine ?

Les souches d'*Escherichia coli* peuvent provoquer des infections extra-intestinales ou intestinales. Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux constituent un groupe distinct provoquant essentiellement des infections du tractus urinaire dans toutes les tranches d'âge ou des septicémies et des méningites chez les jeunes enfants et les jeunes animaux.

Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinaux utilisent des stratégies d'infection communes : colonisation de la muqueuse, échappement aux défenses immunitaires de l'hôte, multiplication et dommages à l'hôte. La catégorie d'*E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) se distingue par ses caractéristiques pathogènes qui peuvent provoquer des

¹ Frank C, Faber MS, Askar M, Bernard H, Fruth A, Gilsdorf A, Höhle M, Karch H, Krause G, Prager R, Spode A, Stark K, Werber D, au nom de l'équipe d'investigation SHU. *Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome*, Allemagne, mai 2011. Euro Surveill. 2011;16(21):pii=19878.

symptômes allant de diarrhées aqueuses ou de colites hémorragiques à un syndrome hémolytique et urémique (SHU).

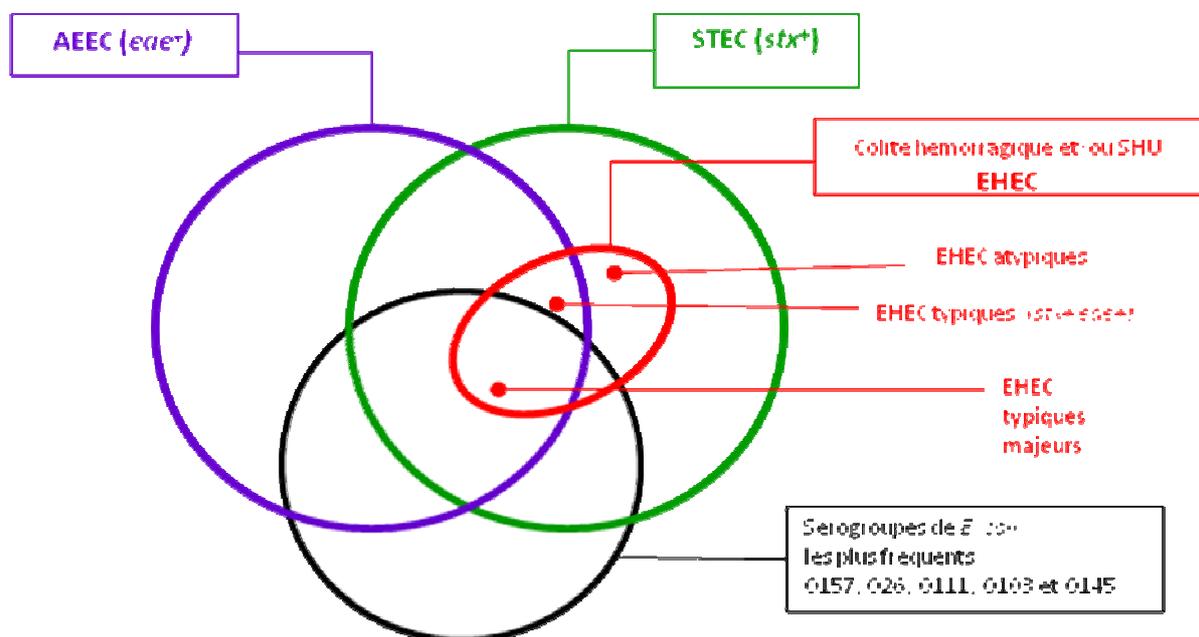
Les souches dites AEEC (pour « *Attaching and effacing E. coli* ») sont définies comme des souches d'*E. coli* produisant des protéines responsables de l'attachement et de l'interaction entre la bactérie et les cellules épithéliales. La protéine Intimine codée par le gène *eae* est une adhésine impliquée dans l'adhésion étroite entre l'AEEC et les cellules épithéliales de l'intestin.

Les *E. coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) désignent des souches d'*E. coli* producteurs de cytotoxines appelées Shiga-toxines, en raison de leur similitude avec une cytotoxine produite par *Shigella dysenteriae* sérotype 1, ou vérocytotoxine, du fait de leur cytotoxicité sur les cellules Vero. Ces deux terminologies sont équivalentes.

Les souches d'*E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) constituent un sous-groupe des STEC et correspondent aux souches isolées chez les patients souffrant de diarrhées (hémorragiques ou non) et/ou de syndrome hémolytique et urémique. Généralement, la caractérisation des EHEC débute par l'identification du sérotype. Les souches de sérotype O157:H7 sont étroitement associées aux infections humaines. En raison de ce lien étroit, les souches EHEC sont communément divisées en deux grands groupes : les souches O157 et non-O157. Plus précisément, les souches EHEC peuvent être sous-divisées en deux groupes en fonction de la présence ou non des gènes *stx* et *eae* :

- **Les souches EHEC typiques** se caractérisent par la présence du gène *stx* et du gène *eae*. Les sérotypes les plus fréquents appartenant à ce groupe sont les suivants O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2 et O145:H28. Ces cinq sérotypes correspondent aux EHEC les plus fréquemment isolés chez l'Homme. Ils sont de ce fait qualifiés d'EHEC typiques « majeurs ».

- **Les souches EHEC atypiques** hébergent des gènes *stx* mais ne possèdent pas de gène *eae*. Les EHEC atypiques peuvent être des souches de sérotypes O91:H21, O113:H21 et O104:H21. Ces souches sont rarement associées à des épidémies.



Source : adapté d'après l'avis de l'Afssa (27 mai 2010)²

AEEC : « *Attaching and effacing E. coli* » ; EHEC : « *Enterohaemorrhagic E. coli* » ; STEC : « *Shiga toxin-producing E. coli* » ; *eae* : gène codant l'Intimine ; *stx* : gènes codant pour les Shiga-toxines ; SHU : syndrome hémolytique et urémique.

Une autre nomenclature, basée sur l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines et leur fréquence d'implication dans des épidémies et des maladies graves, dont le SHU, a été proposée par Karmali et collaborateurs.

² Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008.

Les souches sont classées en cinq sérotypes allant de A à E.

Les souches appartenant au sérotype O157:H7 sont considérées comme les plus virulentes au regard des cas de SHU et de colites hémorragiques. Ces souches sont aussi les plus fréquemment associées aux épidémies. De ce fait, elles sont classées en tant que sérotypes A. Bien que le sérotype O104:H4 ne figure pas dans la classification de Karmali et collaborateurs, les souches appartenant au sérotype O104:H4 peuvent raisonnablement être considérées comme appartenant au sérotype C du fait d'une association rare avec des épidémies.

Qu'en est-il des souches pathogènes O104 ?

Les recherches menées par le Centre national de référence des salmonelles et autres pathogènes entériques bactériens au sein du RKI (à Wernigerode) sur des isolats de patients à Hesse et Bremerhaven, suggèrent que l'épidémie serait due à une souche d'*E. coli* de sérotype O104:H4 présentant les caractéristiques suivantes : productrice de Shiga-toxine 2 (*stx2a*), intimine (*eae*)-négative et entérohémolysine (*hly*)-négative. Cette souche présente une résistance élevée aux céphalosporines de troisième génération et un large spectre de résistance aux autres antibiotiques dont le triméthoprim/sulphonamide et tétracycline.

Ces souches O104:H4 peuvent être classées parmi les EHEC atypiques en raison des résultats PCR pour le *stx* (*stx* positive) et *eae* (*eae* négative). Les gènes *stx* sont absolument indispensables pour provoquer les symptômes du SHU mais d'autres facteurs, impliqués dans la colonisation et la persistance chez l'hôte, sont également nécessaires. Ainsi, les gènes *stx* sont nécessaires mais non suffisants pour caractériser une souche d'*E. coli* pathogène. D'autres recherches menées au RKI ont montré que la souche O104:H4 héberge d'autres déterminants de virulence tels que les gènes *aatA*, *aggR* et *aap*.

Historique épidémiologique du sérogroupe O104

Dans le monde, les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies d'infections à STEC sont : la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, les produits laitiers non pasteurisés, les produits végétaux crus ou non pasteurisés (salade, radis blancs, jus de pommes) et l'eau de distribution (du robinet). Les végétaux et l'eau ont été à l'origine d'épidémies de plusieurs centaines de malades ces dernières années.

La littérature scientifique fait état de très peu de cas d'épidémies alimentaires ou d'infections alimentaires impliquant des souches appartenant au sérogroupe O104. *E. coli* O104:H21 avait été désignée comme la cause d'une épidémie aux États-Unis en 1994. Les soupçons qui avaient alors pesé sur la consommation de lait pasteurisé contaminé n'ont pu être confirmés car ce sérotype n'a été isolé que dans les échantillons de selles des patients infectés et non dans les produits. Par ailleurs, un cas sporadique de syndrome hémolytique et urémique causé par *E. coli* O104:H4 a été signalé en Corée du sud en 2006.

Ainsi, l'identification du sérogroupe O104 reste très rare.

Conditions conduisant à la contamination

Il s'agit dans tous les cas d'une contamination fécale d'aliments d'origine animale ou végétale. Pour les premiers, elle intervient par exemple au stade de la préparation des carcasses à l'abattoir (dépouillement ou éviscération des animaux), ou lors de la traite, lorsque les mesures d'hygiène générale ne sont pas respectées.

Pour les végétaux, cette contamination fécale peut intervenir lors de l'épandage des effluents pour fertiliser les sols ou lors de l'utilisation d'eau d'irrigation contaminée. La bactérie peut pénétrer à l'intérieur des tissus végétaux, migrer et persister dans le végétal mais sans se multiplier.³

Comment détecter ces bactéries pathogènes dans les aliments ou dans l'eau ?

Les STEC comptent 400 sérotypes qui diffèrent considérablement tant en ce qui concerne leurs caractéristiques physiologiques que leur potentiel pathogène pour les être humains. Le sérotype O157:H7 fait la une des journaux depuis le début des années 80. Sa notoriété se justifie par les fréquentes épidémies liées à ce sérotype. Toutefois,

³ Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) (ANSES) ; <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-EscherichiaColi.pdf>

des souches d'*E. Coli* appartenant à d'autres sérogroupes, tels que O26, O103, O111 et O145 peuvent également être à l'origine d'épidémies. Les *E. coli* appartenant au séro groupe O104 ont rarement été impliqués dans des infections humaines.

Pour toutes ces raisons, plusieurs méthodes de détection des souches STEC O157 sont disponibles (la méthode NF EN ISO 16654 ainsi que d'autres méthodes alternatives). Pour la détection des souches non-O157, une spécification technique ISO/CEN (ISO TS 13136) est actuellement utilisée par les laboratoires de référence pour le dépistage des principaux sérogroupes non-O157 (séropathotype B dans la nomenclature de Karmali). Des techniques de séparation immuno-magnétique (IMS) sont disponibles sur le marché afin d'isoler des souches appartenant aux sérogroupes les plus communs d'EHEC non-O157 (O26, O111, O103 et O145).

Une méthode de PCR en temps réel permettant la détection des *E. coli* O104, développée dans le cadre d'une collaboration entre l'ANSES (France) et le BfR (Allemagne), a été publiée en 2010⁴. Cette méthode, a été utilisée avec succès pour détecter la souche allemande O104:H4; son utilisation est recommandée par le BfR. Un protocole reposant sur cette publication a été communiqué par le laboratoire de référence de l'Union européenne (ISS, Italie) au réseau européen de laboratoires nationaux de référence. La procédure est appliquée pour détecter des souches épidémiques de STEC O104 dans des échantillons de denrées alimentaires ainsi qu'au typage moléculaire d'isolats suspectés. L'ISS travaille à sa validation en collaboration avec le laboratoire de référence de l'OMS à l'Institut Statens Serum de Copenhague. Par ailleurs, le laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) a développé une PCR *fliC H4* pour *E. coli* pour rechercher le gène *fliC* spécifique de la souche épidémique.

Des cultures d'enrichissement sont obtenues en ajoutant une prise d'essai de 25 g d'échantillon de denrées alimentaires à 225 ml d'eau peptonée tamponnée, puis incubées pendant 18h à 24h, à 37°C ± 1°C. Un ml d'aliquote de cette culture est utilisé pour l'extraction et la purification d'ADN. Les échantillons permettent de détecter la présence de gènes *stx* (ou *vtx*) et *eae* grâce à la procédure de PCR en temps réel décrite dans la spécification technique ISO TS 13136. Les échantillons qui se révèlent positifs pour les gènes *stx* (ou *vtx*) et négatifs pour le gène *eae* seront ensuite testés pour rechercher le gène associé au séro groupe O104 (*wzxO104*). Les cultures d'enrichissement *wzxO104* -positives serontensemencées sur de la gélose McConkey ou 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. Jusqu'à 50 colonies seront examinées par PCR en temps réel ou PCR conventionnelle pour confirmer la présence du gène *stx* (ou *vtx*) détecté dans la phase de criblage. Les colonies positives pour les gènes *stx* (ou *vtx*) seront testées pour rechercher la présence des gènes *wzxO104* et *fliC H4*, qui code respectivement pour les antigènes O104 et H4. Le LR-UE STEC a souligné que du fait du besoin urgent d'un protocole, la procédure n'avait pas encore pu être validée. Le LR-UE STEC a annoncé qu'il mettrait prochainement à disposition des laboratoires nationaux de référence de l'ADN extrait d'une souche STEC appartenant au séro groupe O104. La confirmation des colonies suspectées constitue une étape cruciale : elle permet la confirmation des sérotypes des souches étudiées et de leurs gènes de virulence.

Il convient de garder à l'esprit que la dose de STEC (ou VTEC) engendrant une infection humaine est très faible. De plus, la plupart des méthodes de détection de STEC sont conçues pour une utilisation avec un seul échantillon de 25g dans un bouillon d'enrichissement de 250 ml. Toutefois, la taille de cet échantillon n'est souvent pas adaptée pour analyser de grandes quantités d'aliments produits par les fournisseurs. Il s'avère souvent difficile d'atteindre les objectifs souhaités en matière de sécurité alimentaire et de disposer d'un protocole d'échantillonnage statistiquement représentatif. De ce fait, il est essentiel que de bonnes pratiques de fabrication soient appliquées à chaque étape de la chaîne agro-alimentaire.

Une mutation des caractéristiques génomiques de ces souches pathogènes est-elle possible entre l'aliment contaminé et l'Homme infecté ?

Les déterminants génétiques ciblés pour la classification des souches d'*E. coli* pathogènes (antigènes somatiques et flagellaires, O et H) sont stables dans le génome. Ainsi, une seule cellule bactérienne ne change pas de séro groupe ni de sérotype dans le temps. Toutefois, des recherches sont encore nécessaires pour mieux connaître les facteurs

⁴ Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. 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.

de virulence dans les souches pathogènes ainsi que leur mobilité au sein du génome bactérien. Les gènes codant pour les Shiga toxines sont généralement portés par des bactériophages tempérés dont le génome est intégré dans le celui des STEC. Ces phages peuvent être transférés entre STEC et *E. coli* (ou d'autres Entérobactéries), ce qui explique la diffusion des gènes *stx* dans plus de 400 sérotypes d'*E. coli*. La transduction des gènes *stx* aux souches d'*E. coli in vivo* a été démontrée dans plusieurs modèles animaux, notamment chez le mouton et la souris. La perte de gènes *stx in vivo* au cours d'infections humaines et *in vitro* pendant la culture de STEC a également été constatée. À ce jour, on peut raisonnablement considérer qu'une souche STEC, détectée dans un aliment contaminé, ne deviendra pas plus dangereuse en infectant les être humains.

Recommandations à l'attention des consommateurs et des patients

Quel que soit le contexte épidémique, la cuisson à cœur des aliments détruit ces bactéries pathogènes et les recommandations d'usage en termes d'hygiène domestique restent applicables. Toutes les mesures susceptibles de prévenir les transferts de contamination sont essentielles. L'Autorité européenne de sécurité des aliments donne des conseils aux consommateurs afin de garantir une bonne hygiène personnelle des mains, en général et avant de manipuler des aliments en particulier⁵.

Les fruits et les légumes doivent être minutieusement lavés et si nécessaire, pelés ; il convient également de se laver soigneusement les mains et de nettoyer et désinfecter les couteaux, les planches à découper et les autres ustensiles de cuisine avant de cuisiner. Ces recommandations s'appliquent à l'hygiène des mains après être allé aux toilettes ou avoir changé une couche.

Dans la situation actuelle, considérée comme une épidémie grave, l'Institut fédéral d'évaluation des risques (BfR) recommande, par mesure de précaution et en complément de ces mesures d'hygiène générales, de ne plus consommer de légumes non cuits, suspectés d'être à l'origine de l'épidémie, jusqu'à ce que la cause exacte de l'épidémie soit identifiée.

Pour les personnes atteintes de diarrhées, il y a lieu de souligner l'importance d'une hygiène méticuleuse des mains afin d'éviter le transfert de la bactérie d'une personne à une autre. Les personnes souffrant de diarrhées hémorragiques doivent immédiatement demander une assistance médicale.