



**UNIVERSITÉ
TOULOUSE III
PAUL SABATIER**



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2020

THESES 2020/TOU3/2086

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

JACQUEZ Aude

***ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC) :
ETAT DES LIEUX AU CHU DE TOULOUSE**

Le 19 novembre 2020

Directeur de thèse: CAVALIE Laurent, PH, Bactériologie - Hygiène hospitalière

JURY

Président: ROQUES-CESCHIN Christine, PU-PH, Bactériologie - Hygiène hospitalière

1er assesseur: OSWALD Eric, PU-PH, Bactériologie - Hygiène hospitalière

2ème assesseur: DUBOIS Damien, MCU-PH, Bactériologie - Hygiène hospitalière

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020**

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
----------------------------	----------------------

Serment de Galien

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Table des matières

Serment de Galien.....	6
Table des figures et des tableaux.....	14
Abréviations	16
Introduction.....	17
Partie I- Revue de la littérature	19
<u>I.1-Pathogénicité des <i>E. coli</i> producteurs de shigatoxines chez l'homme et chez l'animal</u>	19
I.1.1. Place des STEC parmi les autres <i>E. coli</i>	19
a- <i>E. coli</i> entéro-pathogène (EPEC).....	20
b- <i>E.coli</i> entéro-invasif (EIEC).....	20
c- <i>E. coli</i> entéro-agrégatif (EAEC).....	21
d- <i>E.coli</i> entéro-toxinogène (ETEC)	21
e- <i>E.coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	22
I.1.2. Facteurs de virulence	23
a- Shigatoxines Stx1 et Stx2	23
b- Lésions d'attachement/effacement	25
c- Autres facteurs de virulence.....	25
I.1.3. Mécanisme physiopathologique	26
I.1.4. Mode de contamination.....	29
I.1.5.Classification des STEC	31
a- Selon les facteurs de virulence	31
b- Selon le sérotype	32
c- Selon le sérotypage.....	32
d- Selon le typage des shigatoxines	35
I.1.6. Tableau clinique et prise en charge du SHU	36
a- Epidémiologie	36
b- Clinique et pronostic.....	37
c- Etiologies	38
d- Prise en charge	39
I.1.7. Techniques de détection des STEC.....	42
a- Culture	43
b- Détection des toxines	44
c- Détermination des sérogroupes.....	45
d- Caractérisation des souches	45
e- Sérologie.....	45
<u>I.2- Epidémiologie des STEC chez l'animal</u>	46
I.2.1. Evaluation du portage chez l'animal	46
a- Réservoir des STEC	46

b-	Facteurs de variation du portage	47
c-	Estimation du portage intestinal de STEC chez les ruminants.....	49
I.2.2.	Surveillance agroalimentaire.....	52
a-	Contexte réglementaire.....	52
b-	Définition des souches de STEC à surveiller	53
c-	Plans de surveillance agroalimentaire	54
d-	Gestion des alertes	57
I.3-	<u>Epidémiologie des STEC chez l'homme</u>	58
I.3.1.	Historique des épidémies à STEC	58
a-	Au niveau international	58
b-	En France	59
I.3.2.	Surveillance des infections à STEC en France.....	60
a-	Activité du CNR.....	60
b-	Notification des cas groupés d'infections à STEC	61
c-	Notification des cas de SHU pédiatriques	62
I.3.3.	Surveillance des infections à STEC dans le monde	65
Partie II/	Etat des lieux au CHU de Toulouse.....	68
II.1-	<u>Matériel et méthodes</u>	68
II.1.1.	Sélection des échantillons	68
II.1.2.	Mise en place de la technique de PCR.....	70
a-	Choix des sondes et amorces	70
b-	Préparation des échantillons.....	70
c-	Préparation des mix.....	72
d-	Choix des programmes de PCR.....	72
e-	Performances de la méthode	73
II.2-	<u>Résultats</u>	74
II.2.1.	Caractérisation de la population	74
a-	Caractérisation de l'ensemble de la population.....	75
b-	Caractérisation des patients atteints de SHU	76
c-	Profil de virulence.....	77
II.2.2.	Contamination des selles par des souches.....	79
II.2.3.	Analyse rétrospective sur selles de patients par extrapolation	80
II.2.4.	Prévalence des sérogroupes.....	81
a-	Sur l'ensemble des échantillons	81
b-	Chez les patients atteints de SHU.....	82
II.3-	<u>Discussion</u>	84
Conclusion	88
Bibliographie	107

Remerciements

A Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN, merci d'avoir accepté avec plaisir de présider le jury de cette thèse. Merci d'apporter votre expertise de bactériologiste à ce travail.

A Monsieur le Docteur Laurent CAVALIE, merci de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Soyez assuré de toute ma gratitude pour avoir encadré le projet durant cette année, pour le temps que vous m'avez consacré et pour l'aide que vous m'avez apporté. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous.

A Monsieur le Professeur Eric OSWALD, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de nous faire bénéficier de vos connaissances et de votre expertise dans ce travail. Je vous remercie pour le temps accordé à regarder les résultats provisoires, cela m'a aidé à orienter ce travail.

A Monsieur le Docteur Damien Dubois, merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Merci pour ta gentillesse, ta patience et pour la transmission de tes connaissances au cours des stages de bactériologie.

Aux techniciens de biologie moléculaire, Séverine, Damien, Céline et Serge, merci pour votre disponibilité, votre gentillesse pour me former et m'aider dans les difficultés que j'ai pu rencontrer. Merci pour le temps que vous avez passé à extraire certaines de mes souches.

A ma famille,

A mon père, Michel, à ton humour, à ta gentillesse appréciée de tous. A ton amour de la montagne que tu as su nous transmettre. A chaque moment, je sais que j'ai une bonne étoile au dessus de la tête, à ces souvenirs si précieux que je garde en tête.

A ma mère, Sylvie, à ton dynamisme, ta résilience et ta générosité. Merci pour ton soutien au cours de mes études et dans tous mes choix. Je suis très reconnaissante pour ce que tu fais pour moi. A Marcel, merci pour ta gentillesse.

A ma sœur Laure, à tes grandes qualités humaines, à ton écoute et à tes mots qui tombent toujours justes. A ce lien que nous avons et qui ne change pas, malgré la distance. A Quentin, bienvenue dans la famille.

A ma grand-mère Suzanne, merci pour tous ces doux moments d'enfance passés avec toi. Je sais que je peux toujours compter sur toi pour avoir un mot gentil quand j'en ai besoin.

A mon oncle Thierry, je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur tonton. Merci pour toutes ces attentions. Aux concerts et spectacles que tu nous as fait découvrir, aux semaines de révisions à Chamrousse où tu m'as été d'une grande aide.

A mon cousin Arnaud, à ces souvenirs d'enfance passés à s'entretuer au monopoly. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Leslie et votre petit Soan.

A la famille Müller, Hélène et Guy, Anne, Claire, Marc-Olivier, Virginie, et Charlotte, Lucile, Marie, Emma, Constant. J'apprécie toujours les moments passés avec vous.

A Françoise et Jean-Philippe, à votre gentillesse et votre bienveillance. Vous êtes importants pour moi.

A Solange et Jean-Marie, mes grands-parents de cœur.

Françoise et Vincent, merci pour toutes vos gentillesse.

A mes amis,

A mes précieuses amies de lycée,

Charlotte, à ton dynamisme et ta joie de vivre contagieuse, c'est toujours un plaisir d'entendre tes histoires. A cette amitié qui dure et qui nous permet d'évoluer et de grandir ensemble, et à tous les événements qu'on vivra encore.

Solenn, la P1 m'aura fait ce joli cadeau que de rapprocher nos chemins. Merci pour tous ces moments qu'on a pu passer à refaire le monde. Tu as été très présente pour moi, et je t'en suis si reconnaissante.

A mes amis de la fac de pharmacie de Lyon,

A Solenne, à ton optimisme, ton dynamisme, et ta joie de vivre constante. A nos visions de la vie qui sont parfois si semblables, et à ces livres qui, ne nous mentons pas, ne nous ont jamais rendu meilleures.

A Hilel, à ces années passées à s'amuser et à réviser ensemble, au fil de tes coupes de cheveux variées. Merci de toujours me faire découvrir quelque chose de nouveau.

A Blandine, merci de m'avoir fait découvrir la pelure d'oignon. A ta main gauche, et à ton amour des vitrines et des voitures (surtout vues des ponts). A toutes ces belles soirées et ces sorties skis ensemble.

A Laura, à ta sérénité à chaque instant. A ta voix criarde dès que tu aperçois un verre de vin, et surtout, parce que tu as bien du nous le répéter mille fois, merci aux Beatles d'avoir écrit Lemon Tree.

A Chloé, à ces bons moments de dépaysement en voyage avec toi. Merci pour ce soutien mutuel pendant les révisions de l'internat, je n'aurais pas réussi comme cela sans toi.

A Elodie, ma jolie découverte de P2, j'espère qu'on aura l'occasion de repasser des beaux moments ensemble. A Maxime, Sylvain, Lucas, et aux bons moments passés ensemble.

A mes belles découvertes de Toulouse,

A Emeline, merci de m'avoir fait découvrir Toulouse sous ses meilleurs jours, et surtout ses meilleures nuits. Au Mucho et à la salsa pas très prometteuse. Promis, je viendrai goûter ton champagne à Reims, puis ton rhum en Guadeloupe.

A Laure, à ton énergie débordante et à cette amitié qui aura été assez évidente entre nous. J'adore ces diners et verres partagés, et je suis heureuse de savoir qu'on va bientôt reprendre.

A Sophie, à ce week-end dans les vignes où on s'est découvert plus personnellement, et à tout ce qui a suivi. J'adore ta capacité à réaliser que chaque instant est précieux, et ton regard si émerveillé sur tout ce qui se passe autour de toi.

A Imane, à ta douceur, ton humour et ton auto-dérision. A toutes les petites aventures qui t'arrivent, que tu nous racontes si bien.

Aux co-internes de promo,

A Hugo, merci pour ce premier semestre de stage et ces journées de ski. A Ali, te croiser en short pantoufle à l'internat me fera toujours autant rire. A Maximin, à ton humour léger et bien dosé. A ces bons moments passés ensemble à Ranguéil. A Anaïs, à ta rigueur et ta motivation, il en fallait bien une qui tienne debout dans cette promo. A Sabine, ça a toujours été agréable d'être en stage avec toi.

A PD1, mon petit coup de cœur de bactério, tu as rendu ce semestre très agréable, j'espère qu'on arrivera à garder contact.

Aux internes que j'ai pu croiser en stage, Orancie, Marine, Caroline C, Dorian, Laurie et Céline, Caroline G, Pauline, Pierre, Alban, Julia, Julien, Léa, Pierre-Luc, Gauthier, Thibaut, Camille, Noémie, Audrey ; ou à l'internat de Rangueil, Marie, Justine, Cédric, Vincent, Adrien : Merci pour votre compagnie, c'est un plaisir d'apprendre à vous connaître.

Aux 14 allées Paul Sabatier,

A Claire, merci au bon coin de m'avoir permis de te rencontrer. A ces bons moments de partage qui rendent la vie à Toulouse si agréable.

A Victor, merci de nous nourrir comme une mamie le ferait. L'économie française te remercie pour ta contribution au marché du beurre et de la crème. J'espère que tu es prêt pour que la colloc dure encore 20 ans pour qu'on se partage Guillaume.

A Guillaume, pour ce que l'on partage au quotidien.
A ton optimisme sans faille, ton esprit réfléchi et ton humour un peu décapant. Merci d'être là pour moi quand j'en ai besoin, et de m'apporter tant de bonheur le reste du temps. A cette histoire que l'on se crée, et à la jolie suite qui, j'en suis sûre, nous attend.

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Mécanisme physiopathologique des différents pathovars d' <i>E.coli</i> pathogènes intestinaux (Kaper, 2004)	22
Figure 2 : Mécanisme d'action des Shigatoxines. Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shigatoxines (STEC).....	27
Figure 3 : Physiopathologie d'une infection à STEC Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shigatoxines (STEC).....	28
Figure 4 : Flux potentiels de STEC entre le réservoir animal et l'homme Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux <i>Escherichia coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC).....	29
Figure 5 : Système de classification des STEC/EHEC/EPEC/AAEC selon les facteurs de virulence et les signes cliniques, d'après Naylor (2005)	31
Figure 6 : Estimation de la prévalence de STEC O157 chez le bétail dans différents pays (Islam, 2014).....	49
Figure 7 : Schéma des principales étapes de la méthode de recherche des souches STEC hautement pathogènes et acteurs impliqués au cours des plans de surveillance annuels, issu de « Surveillance des <i>E.coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011) » (E. Loukiadis)	55
Figure 8 : Répartition des sérogroupes de STEC toute symptomatologie confondue en 2018, rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR <i>E.coli</i>	60
Figure 9 : Répartition des sérogroupes de STEC détectés chez les patients souffrant de SHU en 2018, rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR <i>E.coli</i>	61
Figure 10: Principaux sérogroupes de STEC isolés dans les selles d'enfants atteints de SHU en France entre 2007 et 2016 (Bruyand, 2019)	63
Figure 11 : Profil de virulence des souches EHEC tous sérotypes confondus - rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR <i>E.coli</i>	65
Figure 12 : Diagramme des pathogènes intestinaux retrouvés par la PCR Mobidiag ^R dans les selles de patients au CHU de Toulouse entre juillet 2018 et juillet 2020.	69
Figure 13 : Symptomatologie digestive des patients ayant une PCR positive pour stx1 ou stx2 entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	74
Figure 14 : Répartition de l'âge des patients ayant une PCR positive pour stx1 ou stx2 entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	75
Figure 15 : Répartition des services des patients ayant une PCR positive pour stx1 ou stx2 entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	76
Figure 16 : Répartition de l'âge des patients atteints de SHU entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	76
Figure 17 : Répartition des services recevant les patients atteints de SHU entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	77
Figure 18 : Profils de virulence retrouvés dans les 190 échantillons de selles positifs pour stx1 ou stx2 en PCR entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse, en fonction de la symptomatologie	78
Figure 19 : Répartition des sérogroupes détectés sur les 190 selles stx+ sur la période juillet 2018 – juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	82
Figure 20 : Répartition des sérogroupes détectés sur les 20 selles de patients souffrant de SHU sur la période juillet 2018 – juillet 2020 au CHU de Toulouse	83

Tableau 1 : Classification de Karmali : classification des sérotypes d'E.coli en séropathotypes adapté de Gyles 2007	33
Tableau 2 : Résultats des plans de surveillance concernant la recherche de STEC dans les viandes hachées de bœuf de 2009 à 2018. Issu du bilan 2018 des plans de surveillance et de contrôle de la surveillance sanitaire des denrées animales et végétales en France	56
Tableau 3 : Fréquence de STEC isolés selon le type d'aliments, issu de The European Union One Health 2018 Zoonoses Report (EFSA, 2019)	57
Tableau 4 : Distribution des sérogroupes de STEC chez les 133 cas de SHU pédiatriques notifiés en France en 2018, issu de SPF.....	64
Tableau 5: Sensibilité des PCR ciblant des sérogroupes O26, O103, O111, O145 et O157, d'après Perelle (2004) et Perelle (2005).....	73
Tableau 6 : Profil de virulence des selles des 190 patients ayant une PCR positive pour stx1 ou stx2 entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse.....	77
Tableau 7 : Résultats de la PCR Mobidiag ^R et de la PCR visant les sérogroupes dans les selles contaminées par des souches de STEC	79
Tableau 8: Fréquence des sérogroupes retrouvés par la PCR multiplex sur selles	82

Abréviations

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

E.coli : *Escherichia coli*

EAEC : *E.coli* entero-agrégatif

ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

EFSA : European Food Safety Authority = Autorité de sûreté alimentaire européenne

EIEC : *E.coli* entero-invasif

EPEC : *E.coli* entero-pathogène

ETEC : *E.coli* entero-toxinogène

EHECt : *E.coli* entero-toxinogène typique

EHECa : *E.coli* entero-toxinogène atypique

Gb3 : globotriosyl céramide 3

InVS : Institut national de veille sanitaire

IRSD : Institut de recherche en santé digestive

NM : non mobile

PAF : facteur d'activation plaquettaire

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

SHU : syndrome hémolytique et urémique

STEC : *E.coli* producteur de shigatoxines

stx : gène codant pour les shigatoxines

UFC : Unité formant colonie

VTEC : *E.coli* producteur de Verotoxines

Introduction

Les STEC, ou *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, sont des entérobactéries responsables d'infections entéro-invasives, et entraînent des complications graves telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU), causant une morbi-mortalité importante chez l'enfant de moins de 5 ans.

Historiquement, les STEC sont décrits pour la première fois en 1977, avec la découverte des Vérotoxines, nommées ainsi du fait de leur cytotoxicité sur cultures cellulaires Vero (cellules rénales de singes verts d'Afrique). Ces toxines sont également appelées shigatoxines en raison de leur similitude avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1. La dénomination VTEC (Verotoxin-producing *E.coli*) était alors couramment utilisée, mais la convention internationale de dénomination de ces germes recommande aujourd'hui l'usage du terme STEC (Shiga-toxine-producing *E.coli*).

En 1982, la première épidémie liée aux STEC est décrite aux Etats-Unis, dans l'Oregon puis au Michigan, après consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide. Quarante-sept personnes sont atteintes, et des analyses sur les selles des patients et sur la viande provenant du lot incriminé, mettent en évidence une souche de *E. coli* de sérotype O157:H7. L'année suivante, les STEC sont retenus comme agents étiologiques possibles de colites hémorragiques et de SHU.

Par la suite, d'autres sérogroupes ont été retrouvés au cours d'épidémies et cas sporadiques de SHU. Une classification de ces sérogroupes en fonction de leur fréquence et de leur virulence a été proposée dans les années 1980, mais celle-ci présente des limites car elle ne tient pas compte des facteurs de virulence acquis par les souches, responsables de leur pathogénicité.

Les complications graves que les infections à STEC peuvent entraîner en font un problème de santé publique. En France, la veille sanitaire repose sur 3 volets : la surveillance et les contrôles agro-alimentaires, la notification des cas groupés d'infections à STEC, et la notification des cas de SHU pédiatriques.

Depuis l'été 2018, les coprocultures standards ont été remplacées au CHU de Toulouse par une PCR multiplex syndromique visant les principaux agents bactériens de diarrhées communautaires. Ce kit commercialisé par Mobidiag^R cible entre autre les facteurs de virulence principaux des STEC, *stx1*, *stx2* et *eae*.

L'objectif de ce travail est de :

- I) mettre en place au laboratoire, sur des échantillons de selles ou sur colonies, une technique de sérogroupage par PCR en temps réel des principaux STEC*
- II) faire une étude rétrospective sur les extraits d'ADN de selles positives aux gènes *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020.*

Partie I- Revue de la littérature

I.1-Pathogénicité des *E. coli* producteurs de shigatoxines chez l'homme et chez l'animal

I.1.1. Place des STEC parmi les autres *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est un bacille gram négatif appartenant à la famille des entérobactéries.

Il représente le germe commensal prédominant de la flore digestive aérobie-anaérobie facultative de l'homme et des animaux à sang chaud. *E. coli* est également impliqué en pathologie humaine.

Son génome est composé de gènes conservés, mais également d'une partie flexible, et l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (transposons, bactériophages, plasmides, îlots de pathogénicité) codant pour des facteurs de virulence est à l'origine du caractère pathogène de certaines souches.

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont différenciées en deux pathotypes :

- Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinales, responsables de diarrhées, qui sont définies en plusieurs pathovars en fonction des facteurs de pathogénicité.
- Les souches d'*E. coli* pathogènes extra-intestinales, responsables d'infections localisées telles que des infections urinaires, et d'infections disséminées telles que des bactériémies ou des infections neuro-méningées comme des méningites, en particulier chez le nouveau-né (*E. coli* K1).

Ces souches pathogènes chez l'homme sont retrouvées dans la flore digestive de certains animaux, qui sont porteurs asymptomatiques et excrètent ces souches dans l'environnement.

Les différentes souches d'*E. coli* pathogènes intestinales sont réparties en pathovars, en fonction des facteurs de virulence et d'adhésion. Hormis les STEC, sont décrits les EPEC, les EIEC, les EAEC, les ETEC et les DAEC.

a- *E. coli* entéro-pathogène (EPEC)

Les EPEC sont impliqués dans les diarrhées aqueuses infantiles, principalement dans les pays en voie de développement. L'incidence diminue avec l'âge, et les cas sont rares chez l'adulte, en raison d'une perte des récepteurs spécifiques avec l'âge et d'un développement de l'immunité.

La pathogénicité des EPEC repose sur la capacité d'induire des lésions dites d'attachement/effacement (Kaper, 2004) :

- 1) Adhésion de la bactérie à l'entérocyte par l'intermédiaire du fimbriae de type IV, autrement appelé pili BFP (bundle forming pili)
- 2) Expression des gènes portés par un îlot de pathogénicité chromosomique nommé LEE (locus of enterocyte effacement).

L'un des produits est l'intimine, codée par le gène *eae*, qui interagit avec le récepteur transmembranaire de l'intimine (Tir) situé sur la membrane de l'entérocyte, impliqué dans un mécanisme de sécrétion de type III (T3SS). Cette interaction entraîne une polymérisation des filaments d'actine de l'entérocyte et ainsi la destruction des microvillosités et de la formation d'une structure 'pedestal-like'.

b- *E. coli* entéro-invasif (EIEC)

Les EIEC appartiennent au même pathovar que *Shigella* spp, ils partagent de nombreuses similitudes biochimiques, génétiques et physiopathologiques avec les shigelles. Ce sont les deux agents infectieux de la dysenterie bacillaire.

Le genre *Shigella* est caractérisé par les caractères biochimiques stricts suivants : immobiles, lactose-, H₂S-, LDC-, mucate-, TTR- et glycérol- (Définition CNR). Les EIEC peuvent avoir des caractéristiques biochimiques différentes et conserveront la mobilité et la capacité de fermenter le lactose et de produire de l'indole comme les *E. coli* commensaux. En revanche, ils peuvent aussi perdre ces caractéristiques et ne pourront alors pas être différenciés des shigelles biochimiquement. Une agglutination avec des antisérums visant les EIEC et les shigelles est alors nécessaire pour les différencier. (Croxen, 2013)

Les mécanismes physiopathologiques des EIEC sont similaires à ceux des shigelles, mais ces germes sont moins virulents, ce qui explique des formes cliniques moins graves et une dose infectante nécessaire supérieure à celle des shigelles.

Les EIEC pénètrent l'épithélium intestinal par transcytose, puis sont phagocytés par les macrophages résidents de la sous-muqueuse. Divers mécanismes moléculaires leur permettent un échappement du système immunitaire, et une induction de l'apoptose. L'invasion des entérocytes se fait par le pôle baso-latéral, puis les EIEC se propagent latéralement entre les entérocytes en utilisant les filaments d'actine cellulaires (Kaper, 2004). La symptomatologie correspond à des diarrhées glairo-sanglantes. Les infections à EIEC se limitent souvent à des diarrhées aqueuses intenses, et se compliquent rarement comme les shigelles.

c- E. coli entéro-agrégatif (EAEC)

Les EAEC sont responsables de diarrhées aqueuses ou glaireuses chez l'adulte et chez l'enfant, rarement sanglantes. Elles peuvent causer de diarrhées persistantes, notamment chez le sujet VIH et chez l'enfant dans les zones d'endémies, parfois à l'origine d'une dénutrition due à la malabsorption.

Les EAEC adhèrent à la membrane des entérocytes par le fimbriae et des adhésines, puis, la sécrétion d'entérotoxines et de cytotoxines entraîne une inflammation de la muqueuse liée à la réponse immunitaire de l'hôte (Clements, 2012).

d- E.coli entéro-toxinogène (ETEC)

Principale cause de la diarrhée aigüe du voyageur dans les pays en voie de développement, les ETEC sont responsables d'un taux de mortalité élevé chez les enfants (<5ans) de ces pays en raison de la déshydratation liée au syndrome cholériforme (Clements, 2012).

Après adhérence à la muqueuse intestinale grâce à divers facteurs d'adhérence et de colonisation, les ETEC sécrètent des toxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST), qui activent respectivement l'adénylate et la guanylate cyclase. Les niveaux d'AMPc et de GMPc intracellulaire s'élèvent, ayant pour conséquence la phosphorylation de CFTR, une excrétion de chlore, à l'origine de la diarrhée osmotique (Croxen, 2013).

e- *E.coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les *E.coli* à adhésion diffuse ont été différenciés des autres pathovars intestinaux en raison de leur mécanisme d'adhésion aux cellules intestinales, différent des voies classiques d'adhérence localisée ou d'adhérence diffuse par lésions d'attachement effacement.

Il n'existe pas de méthode universelle de détection de ces bactéries, l'épidémiologie n'est donc que peu connue. Les *E.coli* à adhésion diffuse sont responsables de diarrhées liquidiennes pouvant être chroniques chez l'enfant (Croxen, 2013)

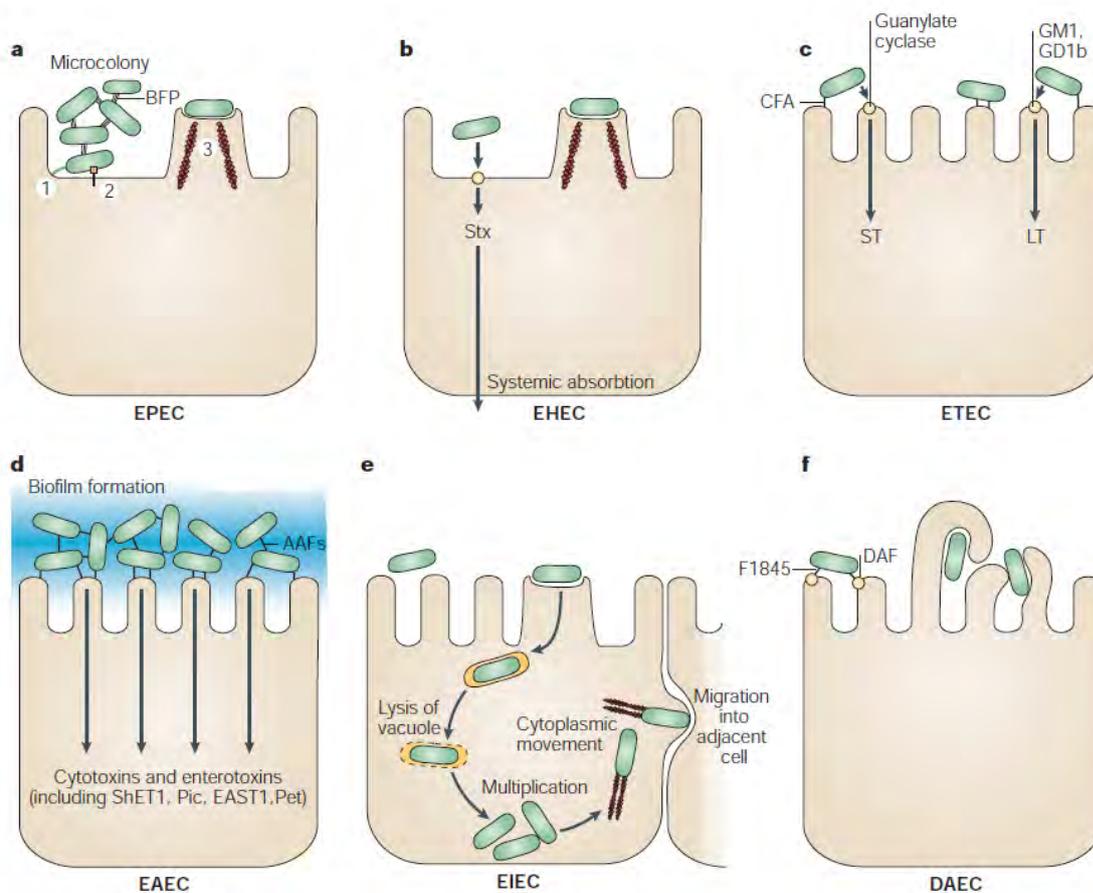


Figure 1 : Mécanisme physiopathologique des différents pathovars d'*E.coli* pathogènes intestinaux (Kaper, 2004)

I.1.2. Facteurs de virulence

Les STEC ont un génome plus grand que la plupart des *E.coli* (5,5-5,9 Mb), en raison de l'acquisition de prophages et éléments intégratifs, qui leur confèrent leurs facteurs de virulence. De nombreux éléments génétiques sont acquis, le rôle de chacun n'est pas établi mais ils semblent jouer un rôle dans la pathogénicité et la colonisation des STEC.

a- Shigatoxines Stx1 et Stx2

Les STEC sont définis par leur capacité à produire les shigatoxines Stx1 et/ou Stx2, qui présentent des homologies avec les toxines de *Shigella dysenteriae* de type 1 : 99 % d'homologie pour Stx1, neutralisable par les anticorps dirigés contre la Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, à l'inverse de Stx2 qui possède moins de 60 % d'homologie. Malgré leurs différences immunologiques, leur mécanisme d'action est le même.

Les shigatoxines Stx1 et Stx2 sont codées respectivement par les gènes *stx1* et *stx2*, portés par un bactériophage, appelé phage *stx*.

Il existe une grande diversité des phages au niveau de la structure, de l'organisation génétique, de la réponse aux agents inducteurs, et de la position du site d'insertion au sein du génome des STEC. Ces phages contiennent des gènes ayant différentes fonctions (régulation, recombinaison, réplication), et ont un cycle de régulation :

- Lors de la phase de lysogénie, l'ADN du phage *stx* est intégré dans le chromosome de *E.coli* et forme ainsi le prophage. L'expression de la plupart de ces gènes est inhibée, dont l'expression des gènes *stx*.
- Sous certaines conditions, cette répression est levée : il s'agit alors de la phase lytique, au cours de laquelle les gènes sont exprimés, les phages *stx* sont produits et libérés.

L'expression des shigatoxines dépend ainsi de l'induction du prophage, contrôlée par la protéine RecA activée. Cette dernière est impliquée dans la signalisation des dommages sur l'ADN bactérien.

D'autres inducteurs régulent le cycle du phage, comme les antibiotiques, le peroxyde d'hydrogène produit lors de stress oxydatif, ou diverses substances chimiques, mais tous les phages *stx* ne sont pas sensibles de la même manière aux différents inducteurs (Krüger, 2014).

De plus, l'expression des phages peut être régulée par la présence d'autres phages dans le génome de l'hôte. La présence simultanée de plusieurs phages *stx* affecte la production de shigatoxines, en augmentant ou diminuant cette production (Krüger, 2014).

La variabilité des phages *stx* pourrait influencer la pathogénicité des souches de STEC, mais également la dissémination des gènes codant pour les shigatoxines, et l'émergence de nouvelles souches de STEC : en effet, certaines études ont retrouvé des phages libres dans des excréments de bovins, des eaux de rivières et des eaux usées (Krüger, 2014)

La présence des bactériophages à l'intérieur de la bactérie est instable et ils peuvent être perdus au cours d'une infection ou de cultures successives.

Les shigatoxines sont des hétérodimères de 70kDa, composés d'une sous-unité A et d'une sous unité B.

Différents sous-types ont été décrits, 3 pour Stx 1 (Stx1a, Stx1c et Stx1d) et 7 pour Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g). Parmi ces sous-groupes, de nombreux variants existent. Ils se distinguent par des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, et de spécificité aux récepteurs. Certains variants semblent associés à des hôtes spécifiques : Stx2e est retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine et responsables de la maladie de l'œdème tandis que le variant Stx2d semble associé aux souches d'origine ovine (Krüger, 2015).

Des études réalisées *in vitro* sur cellules endothéliales rénales et *in vivo* sur modèles animaux montrent que Stx2 semble être plus puissante que Stx 1 (Krüger, 2015).

De plus, au sein des Shigatoxines de type 2, *in vitro*, l'activité cytotoxique de Stx2a et Stx2d était 25 fois supérieure à celle de Stx2b et Stx2c tandis que le pouvoir pathogène de Stx 2a et Stx2d *in vivo* sur des souris était 40 à 400 fois supérieur que celui de Stx1 (Scheutz, 2014). Cela pourrait être lié à une plus grande virulence de certains variants, ou au fait que ces variants pourraient être davantage acquis conjointement à *eae*.

En revanche, la quantité de Stx retrouvée *in vitro* ne semble pas corrélée à la capacité d'induire un SHU chez le patient infecté. Cette quantité de Stx *in vitro* n'est pas le reflet de la quantité de Stx *in vivo* au niveau du site de l'infection, dans des conditions induisant la transcription des shigatoxines (Orth, 2007).

b- Lésions d'attachement/effacement

Par le même mécanisme que les EPEC, certaines souches de STEC sont capables d'engendrer des lésions d'attachement/effacement sur les entérocytes, lorsqu'ils ont acquis l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE. Celui-ci code pour le système de sécrétion de type III, et trois classes de protéines sont sécrétées par son intermédiaire :

- Le gène *eae* code pour l'intimine, une protéine de membrane
- Le gène *tir* code pour le co-récepteur de l'intimine, qui s'insère dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte
- Les gènes *esp* codent pour une seringue moléculaire impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte.

c- Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence encodés par des plasmides peuvent être acquis chez les STEC, augmentant le pouvoir virulent et la persistance chez l'homme.

Des toxines autres que les shigatoxines peuvent être excrétées :

- des hémolysines (gènes *ehxA* et *hlyA*), qui permettent une lyse des hématies, et ainsi une libération du fer qui favorise la croissance bactérienne (Bianca, 2013).
- des entérotoxines (gène *astA*) (Gyles, 2007)
- des cytotoxines (gène *subA*) (Bianca, 2013).

D'autres facteurs de virulence sont également décrits (Karama, 2019):

- catalase peroxydase (*katP*)
- Serine protéase (*espP*)
- Système de sécrétion de type II (*etpD*)

I.1.3. Mécanisme physiopathologique

Après ingestion du STEC par voie alimentaire, la bactérie résiste à l'acidité gastrique. Lorsque la bactérie est au niveau intestinal, elle colonise la muqueuse. Pour cela, certains STEC peuvent faire des lésions d'attachement effacement. En l'absence de l'acquisition de l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE, d'autres mécanismes permettent cette colonisation.

Libérées dans la lumière intestinale, les shigatoxines traversent l'épithélium intestinal et rejoignent la circulation sanguine. Elles peuvent être transportées par les hématies et les polynucléaires neutrophiles pour diffuser jusqu'aux différents organes cibles, et atteindre leurs récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules endothéliales, les récepteurs glycolipidiques Gb3.

La toxine est internalisée par endocytose, puis subit un transport rétrograde jusqu'à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique. La sous-unité A de la toxine a une activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque ainsi la sous-unité 60S du ribosome, composée entre autre de l'ARNr 28S. Cette fixation entraîne l'arrêt de la synthèse protéique et la mort cellulaire.

Cette souffrance des cellules endothéliale est à l'origine de l'expression de facteur tissulaire à leur surface, entraînant l'activation de la coagulation, la libération du « platelet activating factor » (PAF) dans la circulation et l'induction de l'expression de « plasminogen activator inhibitor 1 » (PAI-1), tous ces phénomènes étant prothrombotiques. La toxine semble aussi capable d'activer les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles, favorisant l'agrégation plaquettaire à la surface des cellules endothéliales activées et la dégranulation des polynucléaires, favorisant également des lésions endothéliales dans la microcirculation.

Les lésions endothéliales sont à l'origine de micro-thrombi et de la consommation plaquettaire, mais également d'une anémie hémolytique mécanique due à l'impact des hématies sur ces micro-thrombi au niveau des vaisseaux sanguins, repérables à leur aspect de schizocytes sur le frottis sanguin. Biologiquement, cette anémie est associée à un bilan d'hémolyse évocateur (haptoglobine effondrée, LDH augmentées).

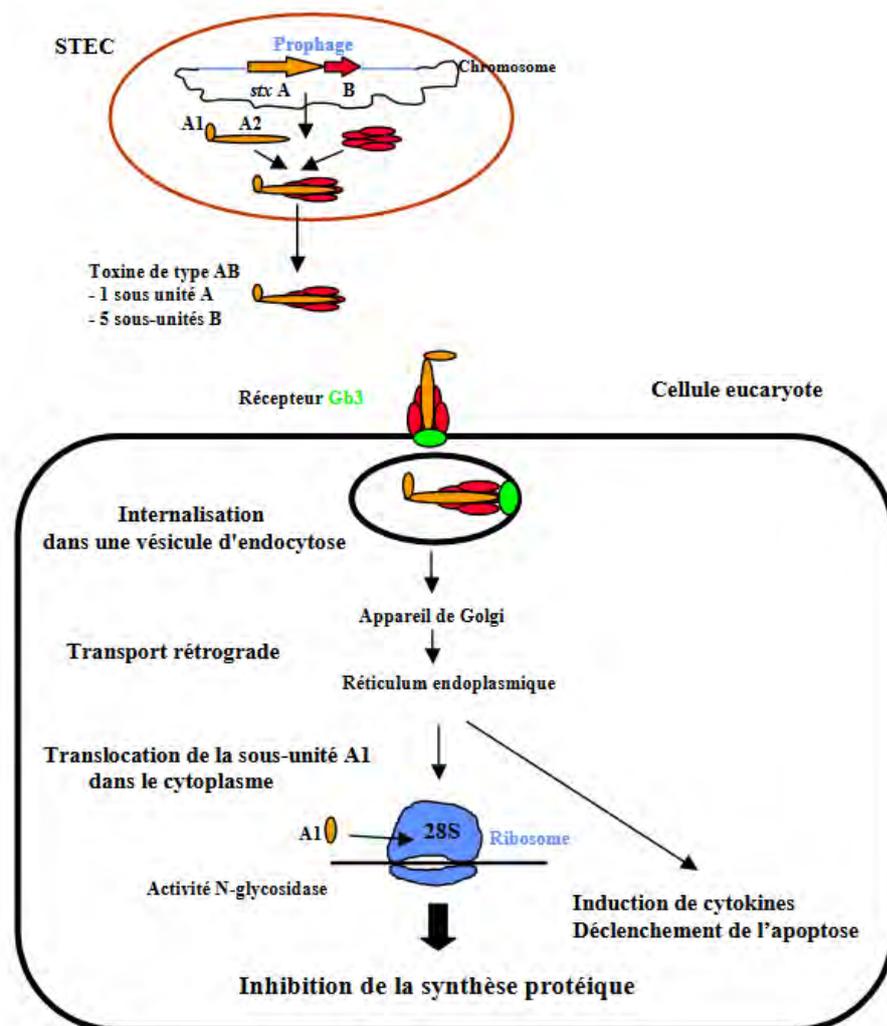


Figure 2 : Mécanisme d'action des Shigatoxines. Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC).

Les shigatoxines augmentent également la synthèse et la libération de facteurs pro-inflammatoires et prothrombotiques par les monocytes et macrophages tels que IL-1, TNF α ou IL-6, au niveau intestinal et endothélial. Un rôle synergique entre les shigatoxines et ces cytokines produites a été observé, les cytokines induiraient la production des récepteurs Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus susceptibles à l'action des shigatoxines.

Les shigatoxines auraient aussi un rôle dans l'inhibition du système de régulation du complément, ainsi que dans l'activation du complément au niveau de l'endothélium vasculaire. Ces phénomènes favorisent la formation de micro-thrombi.

Ces lésions de l'endothélium vasculaire se situent principalement au niveau intestinal, rénal et neurologique, ces organes étant particulièrement sensibles aux toxines en raison d'une

forte concentration en récepteurs glycolipidiques Gb3. De la même manière, ces récepteurs glycolipidiques Gb3 sont davantage exprimés chez l'enfant, ce qui en fait une population à risque.

Au niveau rénal, les lésions endothéliales entraînent un épaissement des parois des capillaires glomérulaires, un élargissement de l'espace sous-endothélial et des lésions glomérulaires. Ces glomérules lésés évoluent vers la sclérose. Des lésions rénales par nécrose corticale peuvent également être observées.

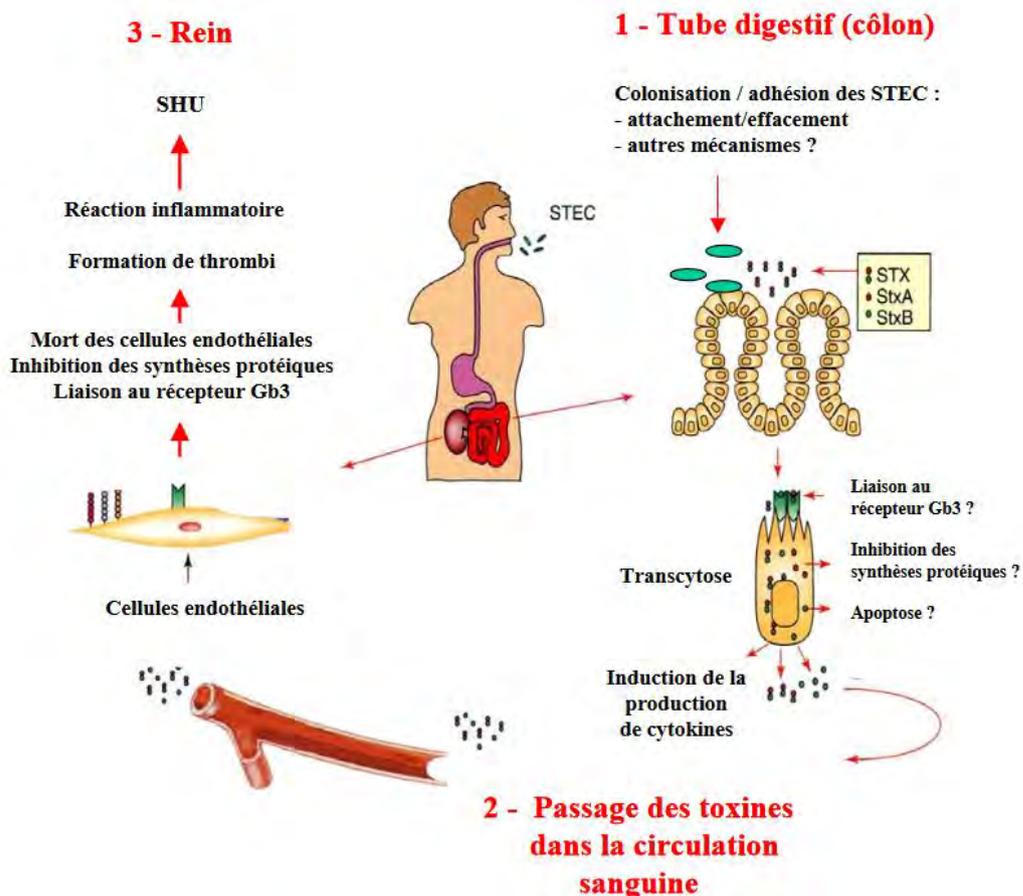


Figure 3 : Physiopathologie d'une infection à STEC
 Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC)

I.1.4. Mode de contamination

La contamination se fait principalement par voie alimentaire, par ingestion de viande insuffisamment cuite (principalement la viande hachée de bœuf), de produits laitiers non pasteurisés, ou de fruits et légumes souillés par les fécès.

Cependant, d'autres modes de contamination sont possibles, comme la voie hydrique avec la boisson d'eau contaminée ou la baignade en eau stagnante, mais également par contamination interindividuelle, par contact avec un sujet symptomatique, ou un contact direct ou indirect avec un animal porteur d'une souche de STEC ou son environnement contaminé.

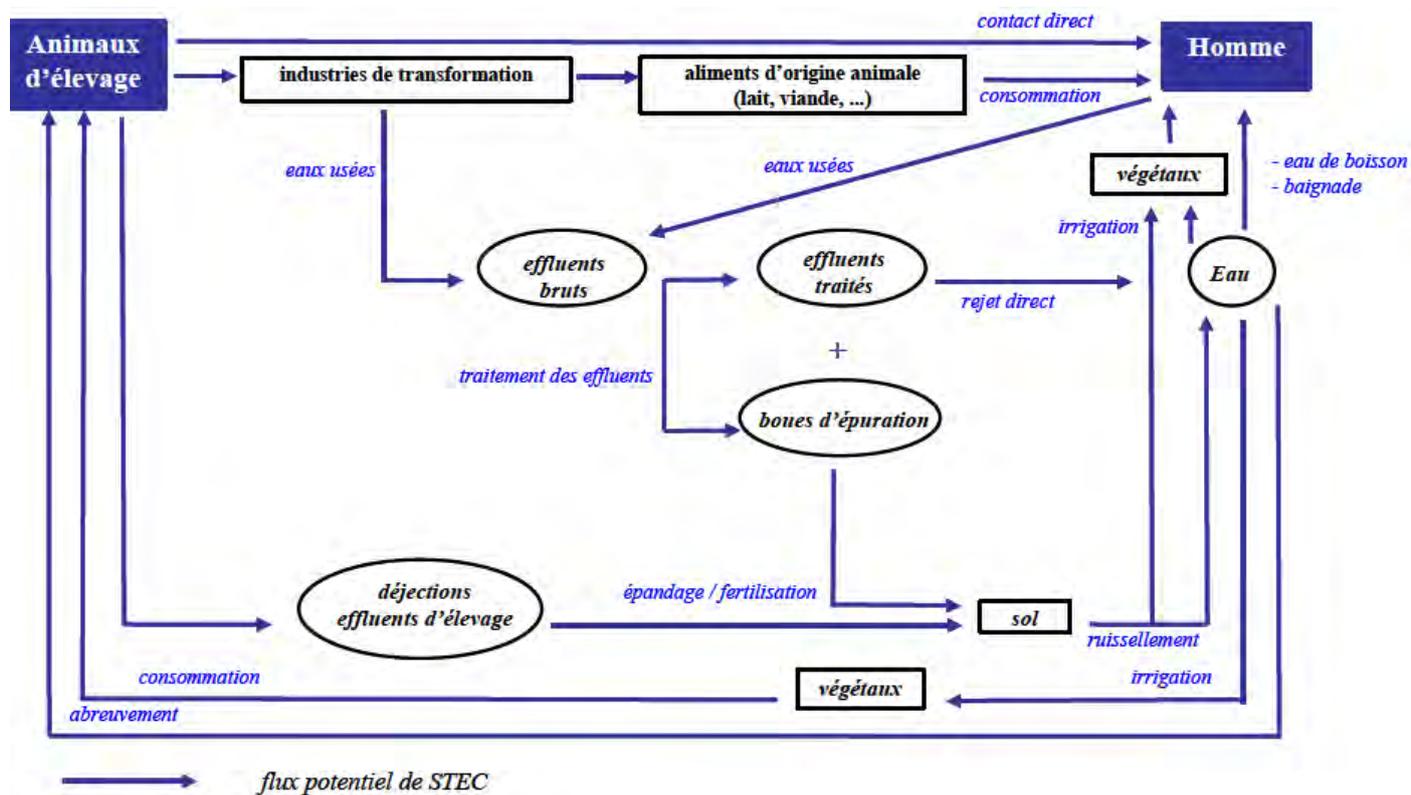


Figure 4 : Flux potentiels de STEC entre le réservoir animal et l'homme
Issu du rapport de l'AFSSA de 2003 – Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC).

Les infections à STEC sont responsables d'épidémies fréquentes dans les pays en voie de développement, liées au péril fécal, ainsi que d'épidémies et de cas sporadiques dans les pays développés.

Les doses infectantes nécessaires sont faibles (environ 100 bactéries) et une recrudescence saisonnière est observée au cours de l'été, lié au fait que le taux d'excrétion fécale des STEC chez les animaux porteurs est plus important.

Dans un rapport européen de 2015 publié par l'ECDC (European Centre for Disease prevention and Control) établi sur la période 2010-2012, 86 % des infections à STEC étaient contractées localement dans la région d'habitation, tandis que 14 % étaient liées au voyage.

Le portage sain n'induit aucune réaction chez le porteur, mais celui-ci peut transmettre le germe pathogène. Sa fréquence est difficile à évaluer, les cas asymptomatiques ne se faisant pas diagnostiquer. Cependant, au cours d'enquêtes épidémiologiques, des souches de STEC ont été isolées chez des sujets asymptomatiques contacts de patients infectés. Les facteurs de sensibilité individuelle sont déterminants dans le portage ou le développement de la maladie.

L'institut de veille sanitaire a décrit en 2006 des mesures de prévention pour limiter la transmission des STEC :

- La viande doit être cuite à cœur, en particulier le bœuf.
- Le lait cru ou le fromage à base de lait cru ne doit pas être consommé par les enfants de moins de 3 ans.
- Les fruits et légumes crus doivent être bien lavés avant d'être consommés.
- Les enfants ne doivent pas boire d'eau non traitée, qui peut potentiellement être souillée.
- Le contact avec les vaches, veaux, moutons, chèvres et avec leur environnement doit être évité chez les enfants de moins de 5 ans.

I.1.5. Classification des STEC

a- Selon les facteurs de virulence

Tous les STEC ne sont pas pathogènes chez l'homme. Seule une partie de ces souches, nommées EHEC (*E. coli* entéro-hémorragique) est responsable d'infections pouvant être graves chez l'homme. Selon les facteurs de virulence, on distingue deux groupes :

- EHEC typiques (EHECt), qui possèdent une shigatoxine et ont acquis l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE.
- EHEC atypiques (EHECa), qui possèdent une shigatoxine mais pas l'îlot de pathogénicité LEE et qui utilisent d'autres moyens d'adhérer à la muqueuse intestinale.

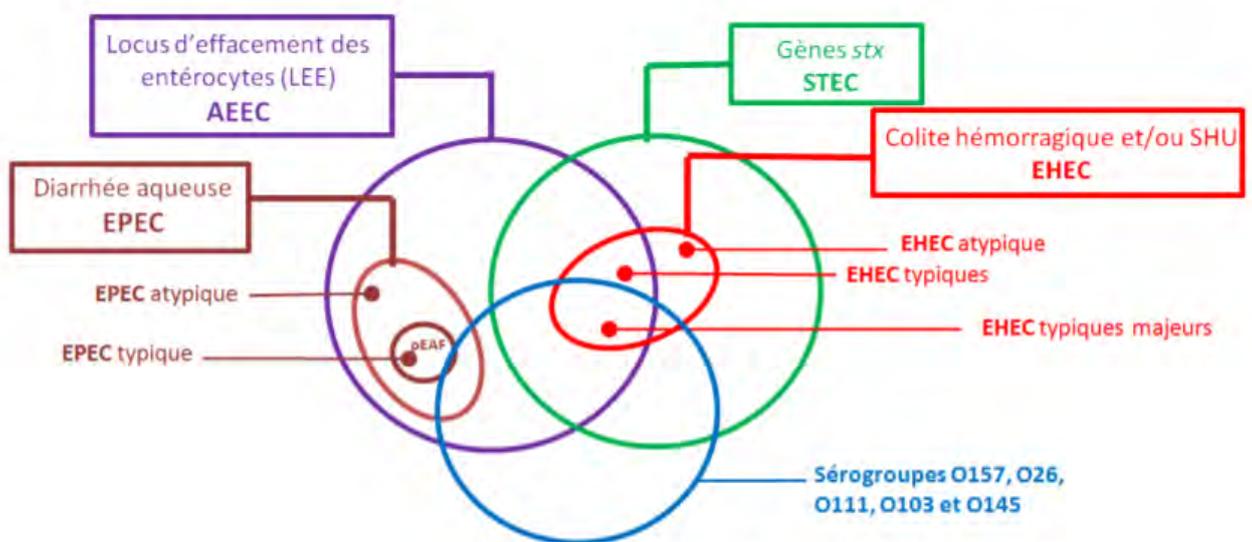


Figure 5 : Système de classification des STEC/EHEC/EPEC/AEEC selon les facteurs de virulence et les signes cliniques, d'après Naylor (2005)

b- Selon le sérotype

La classification de Kauffman, datant de 1947, caractérise les souches selon leur profil antigénique. Comme les autres entérobactéries, les STEC possèdent trois antigènes majeurs :

- L'antigène somatique O membranaire, composant du lipopolysaccharide. Les enzymes impliquées dans sa synthèse sont codées par des gènes regroupés dans le cluster *rfb*.
- L'antigène flagellaire H est généralement codé par le gène *fliC*. Certaines souches perdent leur mobilité.
- L'antigène capsulaire K est une protéine de surface.

Le sérotype est caractérisé par l'identification des antigènes O, tandis qu'en combinant l'identification des antigènes O et H, on définit le sérotype.

La technique d'agglutination sur lame à l'aide d'anticorps spécifiques est un moyen rapide pour typer les souches, mais n'est pas exhaustif. La détection des gènes impliqués dans la synthèse des antigènes O et H est un moyen plus spécifique de sérotyper les souches.

Il existerait plus de 174 antigènes somatiques O et 53 antigènes flagellaires H. Plus de 400 sérotypes de STEC ont été décrits (Amézquita-López, 2018).

Historiquement, le sérotype le plus impliqué dans le syndrome hémolytique et urémique est le O157.

c- Selon le séropathotype

En 2003, une nouvelle classification est proposée (Karmali), tenant compte de la sévérité des cas observés et de la fréquence d'implication des sérotypes dans les épidémies.

Le séropathotype A comprend les sérotypes O157:H7 et O157:NM (non mobile), et est considéré comme le plus virulent.

Le séropathotype B comprend les sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, et O145:NM. Ces sérotypes sont considérés comme étant aussi virulents que O157, mais moins fréquemment impliqués dans les épidémies.

Enfin, les séropathotypes C et D concernent les sérotypes isolés respectivement dans les cas sporadiques de SHU et de diarrhées sans complications, tandis que le séropathotype E est considéré comme non pathogène chez l'homme.

Cette approche a permis une grande avancée pour définir les souches de STEC fréquemment impliquées dans les cas humains, mais également pour cibler les sérotypes d'intérêt isolés chez les ruminants.

Tableau 1 : Classification de Karmali : classification des sérotypes d'*E.coli* en séropathotypes adapté de Gyles 2007

Séropathotypes	Sérotypes	Fréquence (association avec une infection)	Implication (responsable d'épidémie)	Association avec SHU ^a et CH ^b
A	O157 :H7, O157 :HNM	Importante	Souvent	+
B	O26 :H11, O103 :H2, O111:HNM, O121:H19, O145:HNM	Modérée	Peu souvent	+
C	O5 :HNM, O91 :H21, O104 :H21, O113 :H21, O121:HNM, O165:H25	Faible	Rare	+
D	O7 :H4, O69 :H11, O103 :H25, O113 :H4, O117 :H7, O119:H25, O132:HNM, O146 :H21, O171 :H2, O172 :HNM, O174 :H8 □	Faible	Rare	-
E	O6 :H34, O8 :H19, O39 :H49, O46 :H38, O76 :H7, O84:HNM, O88:H25, O98 :H25, O113 :HNM, O136 :HNM, O143 :H31, O156 :HNM, O163 :HNM □	Non impliqué	Non impliqué	-

^aSHU : Syndrome Hémolytique et Urémique, ^bCH : Colites Hémorragiques

Cette classification présente certaines limites. Ne pas tenir compte des facteurs de virulence peut entraîner dans certaines situations des erreurs de classification :

- De nombreuses souches de STEC responsables d'infection ne sont pas complètement sérotypées une fois les facteurs de virulence identifiés.
- Les gènes codant pour les facteurs de virulence des STEC pouvant être acquis horizontalement pour la plupart, il est probable que certaines souches appartenant aux sérotypes n'ayant jamais été associés à des événements de colites hémorragiques ou de SHU puissent acquérir des éléments génétiques mobiles et être

à l'origine d'infections chez l'homme. En utilisant cette classification, ils seraient tout de même classés dans un séropathotype non associé à des infections. Le sérotype seul ne peut donc pas infirmer la pathogénicité d'une souche.

- Inversement, le sérotype seul ne peut confirmer le statut pathogène d'une souche sans connaître ses facteurs de virulence.
- De plus, en tenant compte uniquement du sérogroupe, sans tenir compte des facteurs de virulence, certaines souches hybrides ne seront pas correctement classées, comme par exemple la souche O104:H4, qui est considérée comme appartenant au sérogroupe C devant son occurrence faible, sous forme de cas sporadiques, tandis qu'elle a causé une épidémie d'assez grande envergure en Allemagne en 2011 lorsqu'elle a acquis d'autres facteurs de virulence. Cette classification n'est pas adaptée à ces sérotypes émergents, des souches peuvent faussement être considérées comme non impliquées en pathologie humaine, par omission ou par classification incorrecte.

L'autorité de sûreté alimentaire européenne (EFSA), à travers son groupe scientifique sur les dangers biologiques (BIOHAZ Panel), conclue dans un rapport de 2013 que la classification de Karmali n'étant pas exhaustive, elle ne peut définir la pathogénicité des souches de STEC (EFSA, Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment, 2013). Ce rapport expose les sérotypes impliqués dans les infections à STEC en Europe entre 2007 et 2010. Sur cette période, 85 % des 13545 cas confirmés d'infections à STEC n'ont pas été entièrement sérotypés et ne pouvaient ainsi pas être classés selon la classification de Karmali. 27 % des souches, sérotypées entièrement ou partiellement, appartenaient à un sérogroupe non cité dans cette classification. Sur les 15 % de souches sérotypées, 51 %, 16 % et 1 % appartenaient respectivement aux séropathotypes A, B et C, tandis que 5 % appartenaient au séropathotype D et 0,7 % au séropathotype E, décrit dans la classification de Karmali comme non impliqué dans les infections humaines. Ainsi, environ 10 % des souches seulement auraient été considérées comme pathogènes en utilisant la classification de Karmali.

d- Selon le typage des shigatoxines

Il a été suggéré récemment de réviser cette classification pour la standardiser, en se basant sur le phénotype ou le typage moléculaire des shigatoxines pour définir les groupes (Scheutz, 2014) :

Des études in vitro sur cellules Vero et in vivo montreraient que les sous-groupes de shigatoxines ont une activité biologique plus ou moins importante (Fuller et al, 2011) :

- In vitro, Stx2a et Stx2d auraient une activité cytotoxique 25 fois plus importante que Stx2b et Stx2c.
- In vivo, elles auraient une activité 40 à 400 fois plus importante que Stx1, qui aurait une activité identique à Stx2b et Stx2c.

Les souches qui expriment Stx2 semblent plus virulentes et plus à même d'induire un SHU que les souches exprimant Stx1 seule.

La combinaison du locus LEE avec Stx2 est plus fréquemment associée à une forme clinique plus sévère, à l'inverse de Stx1, peu retrouvé dans les souches isolées d'infections humaines. (Gyles, 2007).

La présence de plusieurs toxines influence le pouvoir pathogène des souches ; l'étude de Krüger (2011) montre qu'une souche exprimant une seule toxine est plus pathogène qu'une souche exprimant plusieurs toxines. L'entérohémolysine, toxine codée par un plasmide, serait associée à une symptomatologie plus sévère (Scheutz, 2014).

Les facteurs de virulence qui contribuent à la pathogénicité des STEC sont variables et les données sont insuffisantes pour qu'une combinaison de gènes codants pour des facteurs de virulence et/ou un sérotype prédisent la survenue de la maladie et de ses complications. Le potentiel pathogène de nombreux sérotypes est à l'heure actuelle inconnu.

Les facteurs liés au patient, tel que l'âge, le statut immunitaire, ainsi que l'inoculum semblent avoir aussi leur importance.

I.1.6. Tableau clinique et prise en charge du SHU

Chez l'homme, après une période d'incubation qui dure de 2 à 10 jours, la clinique débute par une diarrhée bénigne aqueuse. Dans 90 % des cas, elle évolue en 24-72 heures en colite hémorragique, se manifestant par des diarrhées sanglantes, de violentes crampes abdominales, pouvant être accompagnées de nausées et de vomissements. La fièvre est absente ou peu élevée. En l'absence de complications, cette infection est d'évolution favorable en 1 à 8 jours.

Dans 5 à 10 % des cas, des complications surviennent, en général au cours de la deuxième semaine de l'infection, sous formes d'un micro-angiopathie thrombotique. La forme classique est le syndrome hémolytique et urémique. Les lésions endothéliales causées par les shigatoxines entraînent des thromboses capillaires, à l'origine d'une ischémie tissulaire.

L'excrétion dans les selles dure plus d'une semaine chez l'homme, et 3 semaines voir plus chez l'enfant. Le sujet est contagieux pendant cette période.

a- Epidémiologie

Le SHU est une maladie rare : 100 à 160 cas de SHU sont déclarés par an en France chez les enfants de moins de 15 ans. L'incidence est d'environ 1 cas pour 100000 habitants de moins de 15 ans par an. En 2018, l'âge médian des SHU déclarés était de 30 mois. En revanche, cette déclaration étant basée sur une notification volontaire, l'incidence peut être sous-estimée.

Le SHU touche principalement l'enfant de moins de 5 ans. Plusieurs explications sont avancées, comme l'expression plus importante du récepteur Gb3 des cellules endothéliales chez l'enfant, et l'acquisition plus tardive des anticorps dirigés contre les toxines dans la vie (Fakhouri, 2017). Le sujet âgé est aussi une population à risque. Il semble également toucher davantage la femme que l'homme.

Il survient par cas sporadiques et petites épidémies, avec une recrudescence saisonnière qui a lieu l'été, et ponctuellement des épidémies de plus grande envergure.

b- Clinique et pronostic

Le syndrome hémolytique et urémique est une micro-angiopathie thrombotique, caractérisée par une triade : anémie hémolytique mécanique, thrombopénie, et insuffisance rénale aiguë. Divers organes peuvent être touchés, mais les lésions vasculaires sont situées principalement au niveau rénal, puis au niveau neurologique. La thrombopénie est absente chez 15 à 20 % des patients (Fakhouri, 2017).

Le SHU lié aux STEC est généralement précédé de diarrhées sanglantes décrites dans les infections digestives liées aux STEC. Les signes cliniques sont non spécifiques, avec une pâleur, des difficultés respiratoires et une fatigue, liés à l'anémie d'installation brutale, un ictère dû à l'hémolyse, un purpura lié à la thrombopénie, une dysurie et des oedèmes, liés à l'atteinte rénale. Il s'agit de la première cause d'insuffisance rénale aiguë organique chez l'enfant de moins de 3 ans.

Les signes neurologiques peuvent se traduire par des convulsions, une somnolence, une torpeur, des signes de focalisation, voire un coma.

Le SHU peut également se compliquer d'atteintes pancréatiques, hépatiques, ou cardiaques (Loirat, 2012).

Le SHU peut être d'évolution sévère : le taux de mortalité est d'environ 3 % d'après les données de la littérature, 1 % d'après les données de surveillance en France, et les séquelles restent fréquentes, estimées à 30 % à 5 ans de suivi post-SHU chez l'enfant. Elles sont pour la plupart des conséquences de l'atteinte rénale, avec une protéinurie (18 %), une hypertension artérielle persistante (9 %), une altération de la fonction rénale avec diminution du débit de filtration glomérulaire (7 %, dont 1,4 % des enfants en insuffisance rénale terminale). Les séquelles peuvent également être d'ordre neurologique (4 %) (Rosales, 2012).

c- Etiologies

Il existe différentes formes et étiologies de SHU :

- SHU associé à une pathologie ou une condition préexistante (= SHU secondaire) :
Transplantation de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organe solide, maladie auto-immune, médicaments, hypertension maligne, néphropathie
- SHU infectieux, lié au STEC, au pneumocoque, ou à d'autres agents infectieux : grippe A, grippe H1N1, VIH, Shigella
- SHU lié à un déficit en cobalamine C
- SHU atypique
 - o Déficit en diacylglycerol kinase ϵ (DGKE)
 - o SHU associés à un dérèglement du complément constitutionnel ou acquis

Chez l'enfant, 85 à 90 % des SHU sont associés aux STEC, 5 à 10 % sont des SHU atypiques, et 5 % sont associés au pneumocoque. Bien que le taux d'infections invasives à pneumocoque ait diminué, l'incidence de SHU liés au pneumocoque n'a pas diminué chez l'enfant (Fakhouri, 2014).

En revanche, chez l'adulte, la part des SHU associés à des comorbidités n'a pas été documentée.

Le principal diagnostic différentiel du SHU lié au STEC chez l'enfant est le SHU atypique. Chez l'adulte, il s'agit du déficit en ADAMTS-13, à l'origine du purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), ainsi que des SHU secondaires.

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une autre forme de microangiopathie thrombotique, principalement retrouvée chez l'adulte, dont l'organe principalement touché est le système nerveux central. La présentation clinico-biologique est proche de celle du SHU, mais la diarrhée prodromique est souvent absente. Le PTT est lié à un déficit congénital ou acquis en protéase du facteur de Willebrand entraînant la polymérisation de multimères de très haut poids moléculaire de facteur de Willebrand. Ceci entraîne une hyper-agrégation plaquettaire et une thrombopénie. L'association entre le PTT et *E.coli* O157 a été décrite dans un cas clinique en 1990 (Kovacs et al, 1990), mais le diagnostic du PTT était posé sur les critères clinico-biologiques et non sur une recherche

étiologique mettant en cause un STEC. Plus récemment, il a été montré que les mécanismes physiopathologiques du SHU et du PTT étaient différents malgré une similitude de présentation (Tarr 2009).

La recherche de STEC dans les selles est recommandée pour tout patient présentant un syndrome hémolytique et urémique, afin d'adapter la démarche diagnostique et thérapeutique. Le but est également de prévenir le risque de rechute et de séquelles rénales sévères, plus important en cas de SHU atypique non traité par eculizumab. De plus, en l'absence de détection de STEC et en l'absence de comorbidités, des explorations génétiques supplémentaires peuvent déterminer la cause du SHU atypique (déficit en DGKE, anomalie constitutionnelle du complément).

d- Prise en charge

La prise en charge du syndrome hémolytique et urémique repose principalement sur le traitement symptomatique.

A la phase aigüe, environ 70 % des patients nécessitent une transfusion de culots de globules rouges, et 50 % des patients nécessitent une épuration extra-rénale. A la phase aigüe, la surveillance du volume circulatoire est primordiale afin d'éviter la survenue d'une déshydratation en cas de persistance de diarrhées ou d'une hyperhydratation au cours d'une anurie.

Les antithrombotiques et antifibrinolytiques, les anti-inflammatoires, les diurétiques, les transfusions plaquettaires ainsi que la corticothérapie n'ont montré aucun bénéfice. (Picard, 2015 ; Fakhouri, 2017) Aucun traitement spécifique n'est validé dans le traitement du SHU lié au STEC : antibiothérapie, inhibiteur du complément (Eculizumab qui est préconisé dans les SHU atypiques), plasmaphérèses.

Les antibiotiques ont longtemps été contre-indiqués chez les patients atteints d'infections intestinales à STEC : ceux-ci pourraient augmenter le risque de développer un SHU, en favorisant la libération de toxines lors de la lyse bactérienne, et en sélectionnant le STEC dans la flore bactérienne intestinale. De plus, certains antibiotiques, comme les fluoroquinolones, en particulier la ciprofloxacine, pourraient favoriser l'expression de la

toxine par la bactérie. Il y a cependant peu de preuves scientifiques, et celles-ci reposent sur des méta-analyses ou des études rétrospectives sur grandes séries de patients :

- Une méta-analyse reprenant les études rétrospectives publiées entre 2002 et 2015 conclue à un sur-risque de développer un SHU en cas de traitement antibiotique d'une infection à STEC (Freedman, 2016).
- Une étude prospective américaine de 2012 sur une population pédiatrique retrouve une corrélation significative entre la prise d'antibiotiques au cours d'une infection à STEC et la survenue ultérieure d'un SHU. La polynucléose neutrophile initiale et les vomissements lors des diarrhées initiales apparaissent comme des facteurs prédictifs de la survenue d'un SHU (Wong, 2012).
- Une étude cas-témoin montre un lien entre la prise d'antibiotiques bactéricides, en particulier les bêta-lactamines, et la survenue d'un SHU a posteriori (Smith, 2012).

Cependant, des antibiotiques sont souvent prescrits en probabiliste aux patients lors de l'apparition de diarrhées profuses, avant d'avoir les résultats de la coproculture.

Des études ont été réalisées in vitro d'une part pour évaluer la cytotoxicité et l'expression des toxines dans un environnement contenant des antibiotiques, et in vivo d'autre part pour analyser la sécrétion de la toxine dans les selles de souris traitées par divers antibiotiques (Agger, 2015).

Les résultats montrent une tendance à l'augmentation de la sécrétion des toxines avec les antibiotiques inhibant la synthèse d'acides nucléiques (comme les fluoroquinolones), de même que l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole et les antibiotiques inhibant la croissance de la membrane bactérienne (comme les bêta-lactamines). A l'inverse, les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique (comme les macrolides ou les cyclines) semblent diminuer la sécrétion de toxines. De plus, les macrolides réduiraient l'excrétion de toxines dans les selles et la mortalité chez les modèles murins inoculés (Agger, 2015).

Ces résultats sont à nuancer : il existe des discordances entre les études in vitro et les études in vivo, liées aux concentrations en antibiotiques et au fait que l'activité transcriptionnelle en toxine n'est pas toujours le reflet de son activité cytotoxique.

Lors de l'épidémie de SHU liés à une souche O104 en 2011 en Allemagne, le double profil de virulence hémorragique et agrégatif de la souche était responsable d'un portage chronique fréquent chez les malades, ayant deux conséquences : la survenue de diarrhées chroniques d'une part, et, d'un point de vue épidémiologique la contamination interhumaine par l'excrétion de STEC dans les selles. Une étude cas-témoin incluant des sujets ayant présenté une infection liée au STEC O104, SHU ou non, montre que le traitement par azithromycine permet une diminution du portage chronique de STEC de 4,5 % dans le groupe traitement contre 81,4 % dans le groupe témoin, à 28 jours de l'infection. De plus, aucun des patients inclus n'a développé de SHU après instauration du traitement par azithromycine (Nitschke, 2012).

Un essai clinique multicentrique randomisé en double aveugle lancé en 2015 en cours en France, entre autre au CHU de Toulouse, intitulé ZITHROSHU (NCT02336516), teste l'efficacité d'un traitement par azithromycine, en comparaison à un placebo. Les patients inclus sont âgés de 6 mois à 18 ans et sont atteints d'un SHU post diarrhéique.

Le niveau de preuve scientifique actuel ne permet pas de statuer sur la place des antibiotiques, et en particulier de l'azithromycine dans le traitement du SHU lié aux STEC. La Haute Autorité de Santé préconise qu'un traitement par azithromycine pendant 3 jours peut être envisagé chez les sujets porteurs de STEC dans le cadre d'un dépistage (Rafat, 2017).

L'eculizumab (Soliris[®]) est un anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre la fraction C5 du complément. Son efficacité est montrée dans le SHU atypique depuis 2011. Lors d'un SHU à STEC, les shigatoxines ont un rôle dans l'inhibition du système de régulation du complément, ainsi que dans l'activation du complément au niveau de l'endothélium vasculaire. Cela a pour conséquence l'activation du complément. En 2011, une équipe a présenté 3 cas d'enfants atteints d'un SHU lié au STEC de présentation neurologique grave, avec une nette amélioration clinique après administration d'eculizumab (Lapeyraque, 2011). Cependant, aucun essai contrôlé randomisé ne confirme cela. Au cours de l'épidémie de STEC O104 en Allemagne en 2011, certains patients considérés graves sur le plan rénal ont été traités par eculizumab, et le bénéfice par rapport aux traitements symptomatiques ne paraissaient pas évidents (Walsh, 2019). Un essai contrôlé (contre placebo) randomisé nommée ECULISHU (NCT02205541) a eu lieu à Toulouse de 2014 à 2019.

D'autres traitements visant à neutraliser les toxines sont à l'étude :

- Les anticorps monoclonaux humanisés anti-Stx sont prometteurs chez l'animal : in vitro, ils ont un effet cytoprotecteur. In vivo, ils allongent la survie des souris infectées et sont efficaces dans le modèle de SHU chez les cochonnets, avec une survie meilleure que sur le groupe contrôle. (Mariani-Kurkdjian , 2012).
- Le Synsorb Pk^R est une silice porteuse de récepteurs saccharidiques fixant les toxines Stx, qui, donnée par voie orale, n'a pas montré d'effet bénéfique dans un essai en double aveugle randomisé.
- D'autres molécules sont testées chez l'animal, ayant une forte affinité pour les toxines Stx : Des polymères analogues du récepteur Gb3 par voie orale, des analogues solubles de Gb3 par voie intraveineuse, ou des probiotiques qui produisent un analogue du récepteur Gb3 donnés par voie orale.

I.1.7. Techniques de détection des STEC

L'excrétion de STEC dans les selles dure seulement quelques jours après l'épisode diarrhéique, ce qui rend la détection parfois difficile, le patient n'étant plus forcément excréteur lorsqu'il présente des symptômes évocateurs de SHU.

Lors du SHU, la diarrhée peut être absente. Il est alors indispensable d'effectuer un écouvillonnage rectal pour la documentation bactériologique.

En pratique, la confirmation biologique d'un SHU post-diarrhéique n'est effective que dans 70-80 % des cas (Bruyand 2018), même avec un screening des selles par technique moléculaire et une sérologie visant les anticorps anti-LPS.

a- Culture

La culture a longtemps été la technique de référence pour la détection des STEC. Il s'agit d'un bacille gram négatif, oxydase négatif et lactose positif.

Lorsque *E.coli* O157:H7 a été identifié comme agent responsable de colites hémorragiques, il a été mis en évidence qu'à l'inverse de la plupart des autres souches d'*E.coli*, cette souche ne fermentait pas le sorbitol : des géloses MacConkey-sorbitol, où le lactose a été remplacé par du sorbitol, sont utilisées. Cependant, la valeur prédictive positive n'est que de 28 %, en raison de la présence d'autres bactéries ne fermentant pas le sorbitol, mais n'étant pas des souches toxigènes. De plus, cette gélose ne permet pas la détection des souches toxigènes non-O157 pouvant causer des infections.

Un milieu chromogène CHROMagar™ O157 a été développé en 2013, sur lequel les *E.coli* O157 apparaissent sous forme de colonies mauves, tandis que les autres *E.coli* sont bleues. Tout comme le milieu sorbitol Mac Conkey, ce milieu ne permet pas la détection des STEC non-O157. Cependant, la sensibilité de détection des O157 est meilleure.

Durant l'épidémie de 2011, un milieu chromogène a été développé, CHROMagar™ STEC O104 pour détecter les souches de O104 :H4.

Un milieu chromogène supposé détecter tous les sérotypes, CHROMagar™ STEC a ultérieurement été mis sur le marché. Un essai avec des selles sanglantes montre qu'il détecte 72 % des sérotypes non-O157 (Parsons, 2016). Bien que les sensibilité, spécificité et valeur prédictive négative soient acceptables, la valeur prédictive positive reste insuffisante, en raison de la détection des souches non toxigènes.

Ainsi, aucun milieu de culture ne semble suffisant pour incriminer une souche isolée à partir de selles, en l'absence d'indication sur son caractère toxigène. En revanche, ces milieux peuvent permettre d'isoler la souche suspecte afin de la caractériser, à l'aide d'une autre méthode, comme la détection de toxine ou le sérotypage, par des tests immuno-enzymatiques ou par des méthodes moléculaires.

b- Détection des toxines

La détection des toxines peut se faire par des techniques immunologiques ou moléculaires.

Les premiers tests immunochromatographiques devaient être réalisés sur colonies, imposant l'isolement des bactéries sur milieux solides. Des tests immunochromatographiques et immunoenzymatiques à réaliser sur selles ou sur milieux d'enrichissement ont secondairement été développés. Il faut être prudent lors de l'utilisation seule de ces tests pour la détection des STEC. En effet, des faux positifs ont été décrits, certains tests pouvant croiser avec d'autres agents infectieux.

Une autre approche pour détecter les toxines est l'approche moléculaire, par la détection des gènes codant pour les shigatoxines, *stx1* et *stx2*. Dans un premier temps sont apparues les PCR en point final, sur les colonies, puis sur les extraits d'ADN issus des selles. Désormais, il existe des PCR en temps réel, permettant, à l'aide de plusieurs fluorochromes, la détection simultanée des plusieurs toxines, ainsi que d'autres facteurs de virulence comme *eae*, et de gènes codant pour les sérogroupes principaux, ou, dans une approche dite « syndromique », d'autres pathogènes intestinaux. Différentes trousse commerciales existent :

- Test BD MAX^R Bactéries entériques de Becton Dickinson^R, ciblant *Campylobacter*, *Salmonella spp*, *Shigella sp.* et STEC.
- Panel gastro-intestinal FilmArray^R de Biomérieux (Biofire), ciblant *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxine A/B), EAEC, EIEC, EPEC, ETEC, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, STEC dont *E.coli O157*, *Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus et cholerae)*, *Yersinia enterocolitica*, ainsi que des virus et des parasites intestinaux.
- Panel gastro-intestinal xTAG^R de Luminex, ciblant *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxine A/B), ETEC, *Salmonella*, *Shigella*, STEC et *E.coli O157*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* (Mengelle, 2013).
- Amplidiag Bacterial GE^R commercialisé par Mobidiag^R, qui cible *Campylobacter*, EAEC, EPEC, ETEC, *Salmonella*, *Shigella/EIEC*, *Yersinia*, STEC (Rintala, 2016).

Certaines amorces utilisées manquent de sensibilité pour certains variants de *stx2* car elles ciblent une région variable (Chui, 2010).

La détection des toxines par PCR est plus sensible. L'inconvénient principal de la détection par PCR à partir de l'échantillon est l'absence de colonies isolées, ne permettant donc pas la caractérisation ultérieure de la souche.

c- Détermination des sérogroupes

Les sérogroupes peuvent être déterminés par agglutination à partir de colonies, ou par technique moléculaire visant les différents sérogroupes, sur l'échantillon initial ou sur colonie. Lors de la détection par PCR de *stx* et d'un séro groupe, il est intéressant d'isoler la souche et de reproduire la PCR sur la colonie, afin de s'assurer que le séro groupe et les facteurs de virulence détectés sont bien portés par la même souche.

d- Caractérisation des souches

A une visée épidémiologique, il peut être intéressant de savoir si deux bactéries de même sérotype ont la même origine. Le but est de détecter les cas groupés ou de déterminer une source commune de contamination. Des techniques d'électrophorèse sur gel à champ pulsé (PFGE) ou l'analyse moléculaire des séquences répétées (MLVA) sont classiquement utilisées (Gyles, 2007). Le séquençage nouvelle génération (NGS) peut aussi être utilisé pour caractériser les souches (Amézquita-López, 2018).

e- Sérologie

Au cours d'une infection due aux STEC, les patients développent des anticorps anti-LPS. La détection des IgM et des IgA anti-LPS dans le sérum peut être une alternative au diagnostic de SHU lié au STEC lorsque la recherche de STEC dans les selles est négative en raison d'un prélèvement tardif ou d'un traitement antibiotique. En revanche, les tests ne détectent que les anticorps dirigés contre les sérogroupes les plus fréquemment retrouvés.

I.2- Epidémiologie des STEC chez l'animal

I.2.1. Evaluation du portage chez l'animal

a- Réservoir des STEC

Les bovins porteurs sains constituent le réservoir principal des STEC avec un portage au niveau intestinal, et sont responsables de la dissémination des STEC dans l'environnement. Il existe également des bovins appelés « super excréteurs », qui disséminent de grandes quantités de STEC dans l'environnement.

En raison de l'absence de récepteurs pour les shigatoxines, les ruminants ne sont pas sujets aux toxinémies ni aux dommages vasculaires, et sont ainsi fréquemment porteurs asymptomatiques. Les STEC peuvent être responsables de diarrhées chez le veau mais le phénomène toxique n'est pas en cause. Peu d'animaux sont sensibles à la production des shigatoxines. Seuls les porcs développent la maladie de l'œdème due à la toxine Stx2e qui reconnaît le récepteur membranaire Gb4, se manifestant par des œdèmes au niveau du front, des paupières et du larynx, ainsi que par une cécité et des troubles neurologiques.

La contamination de la viande se fait principalement par les fécès au moment de l'éviscération des bovins. Les cuirs peuvent aussi être contaminés directement par les fécès des animaux ou indirectement par l'environnement, et également causer une contamination des carcasses au moment de l'éviscération (Moxley, 2014).

Les petits ruminants, comme les ovins et les caprins, constituent également un réservoir important de STEC : en Europe, en 2015, la prévalence de STEC chez les ovins et les caprins était de 18,5 % (4,3 % pour les STEC O157) tandis qu'il était de 8,3 % chez les bovins et 8,3 % chez les porcins (EFSA, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015, 2016).

Des études ont montré que les fécès et la viande de mouton constituaient un important réservoir de souches STEC pathogènes pour l'Homme (Duffy & McCabe, 2014).

De nombreuses espèces d'oiseaux représentent un risque de dissémination des souches de STEC dans l'environnement, notamment au niveau des fermes qui représentent pour eux une source de nourriture.

Les animaux de compagnie sont également susceptibles d'excréter des STEC, notamment les chiens mais également les chats et les rongeurs, et peuvent infecter l'homme par contact direct.

Les poissons et crustacés peuvent être infectés lorsque leur environnement est infecté par des fèces contenant des STEC, et l'homme peut s'infecter s'il consomme ces produits crus ou peu cuits.

b- Facteurs de variation du portage

De diverses études épidémiologiques visant à connaître le taux de portage intestinal des STEC chez les bovins ont été publiées. Des variabilités entre les études sont observées, à la fois en raison de la variabilité dans les méthodologies mises en œuvre, mais également de la variabilité inter et intra-individuelle du portage de STEC chez les bovins.

L'excrétion de STEC chez les ruminants est intermittente, et l'inoculum est parfois faible, ce qui explique que des détections moléculaires n'aboutissent pas toujours à l'isolement de bactéries.

Il a été décrit que la prévalence de portage de STEC chez les bovins était plus élevée chez les veaux au sevrage et les jeunes bovins que chez les bovins adultes. La diversité du microbiote due au changement d'alimentation chez l'adulte pourrait empêcher la colonisation durable des STEC.

Une équipe américaine a étudié le portage de STEC chez 48 vaches et leurs 48 veaux, à différentes périodes de la vie du veau, à savoir au sevrage, à l'engraissement, et à l'abattage (Ekiri, 2014). Dans la population de veaux, la prévalence des STEC était plus importante sur le prélèvement au moment du sevrage (23 % de portage STEC O157 et 16 % de portage de STEC non-O157), que sur ceux réalisés au cours de l'engraissement (2 % de portage de STEC O157, 6 % de portage de STEC non O157) ou de l'abattage (2 % de portage de STEC O157 et de STEC non O157).

La prévalence du portage des STEC semble être plus élevée l'été que l'hiver, en adéquation avec la saisonnalité des infections à STEC chez l'homme. Cependant, certaines études aboutissent à des résultats opposés :

- Une étude canadienne conclue à une plus forte prévalence des sérogroupes O157, O26, O45, O103 et O121 en été, mais à une prévalence des sérogroupes O145 et O111 supérieure en hiver (Stanford, 2016).
- Une étude américaine sur 891 bovins montre l'absence de différence significative du portage d' *E.coli* O157 en fonction des saisons au Kansas (Alam, 2006).
- Une étude écossaise met en évidence une plus forte prévalence du portage de STEC O157 chez les bovins l'hiver, mais les quantités de STEC excrétées par les bovins super-excréteurs seraient plus élevées l'été. (Ogden, 2004).

Il serait donc plus intéressant de comparer la quantité de STEC excrétés dans l'environnement, qui constitue un risque important de propagation des pathogènes chez l'homme et sur les carcasses, plutôt que le nombre de bovins porteurs.

La différence entre les méthodologies rend parfois la comparaison entre les études difficile :

- Le choix des prélèvements varie du prélèvement d'un animal isolé au mélange de prélèvements fécaux du troupeau. Au sein d'un élevage, tous les animaux ne sont pas forcément porteurs. Ainsi, faire des prélèvements sur plusieurs animaux permet une meilleure détection des STEC.
- En ce qui concerne les techniques utilisées, certaines études ne réalisent pas d'enrichissement avant la mise en culture, limitant la sensibilité lors de l'isolement.
- Les critères de sélection des échantillons sont variables. Dans certaines études, seuls les prélèvements *stx+* et *eae+* en PCR sont mis en culture afin d'isoler les STEC typiques, tandis que dans d'autres, les prélèvements positifs en PCR pour *stx+* ou pour un des sérogroupes visés sont pris en compte. Ainsi, le nombre de STEC isolés n'est pas strictement comparable en fonction de la méthodologie utilisée.

c- Estimation du portage intestinal de STEC chez les ruminants

Au niveau international, une méta-analyse reprend les études publiées entre 1980 et 2012 concernant le portage intestinal de STEC O157 du bétail afin d'en estimer le portage. 140 études sont incluses, soit 220 427 bovins (Islam, 2014).

La prévalence globale du portage de STEC chez les bovins est estimée à 5,68 % dans le monde, avec des disparités selon les régions : l'Afrique est la plus touchée avec un portage estimé à 31,20 %. Le portage est évalué à 7,35 % en Amérique du Nord, puis 6.85 % en Océanie, 5,15 % en Europe, 4,69 % en Asie et 1,65 % en Amérique Latine. En revanche, peu de données concernent l'Afrique, l'Amérique Latine et l'Océanie en comparaison avec les autres régions. La plupart de ces études sont réalisées dans de grandes structures agricoles, n'estimant ainsi pas le portage des STEC dans les petites structures, pourtant très présentes dans certaines zones, en particulier en Afrique et en Asie. Cette méta-analyse n'ayant étudié que le portage du sérotype O157, le portage n'est pas le reflet de l'ensemble des STEC responsables de pathologies chez l'homme.

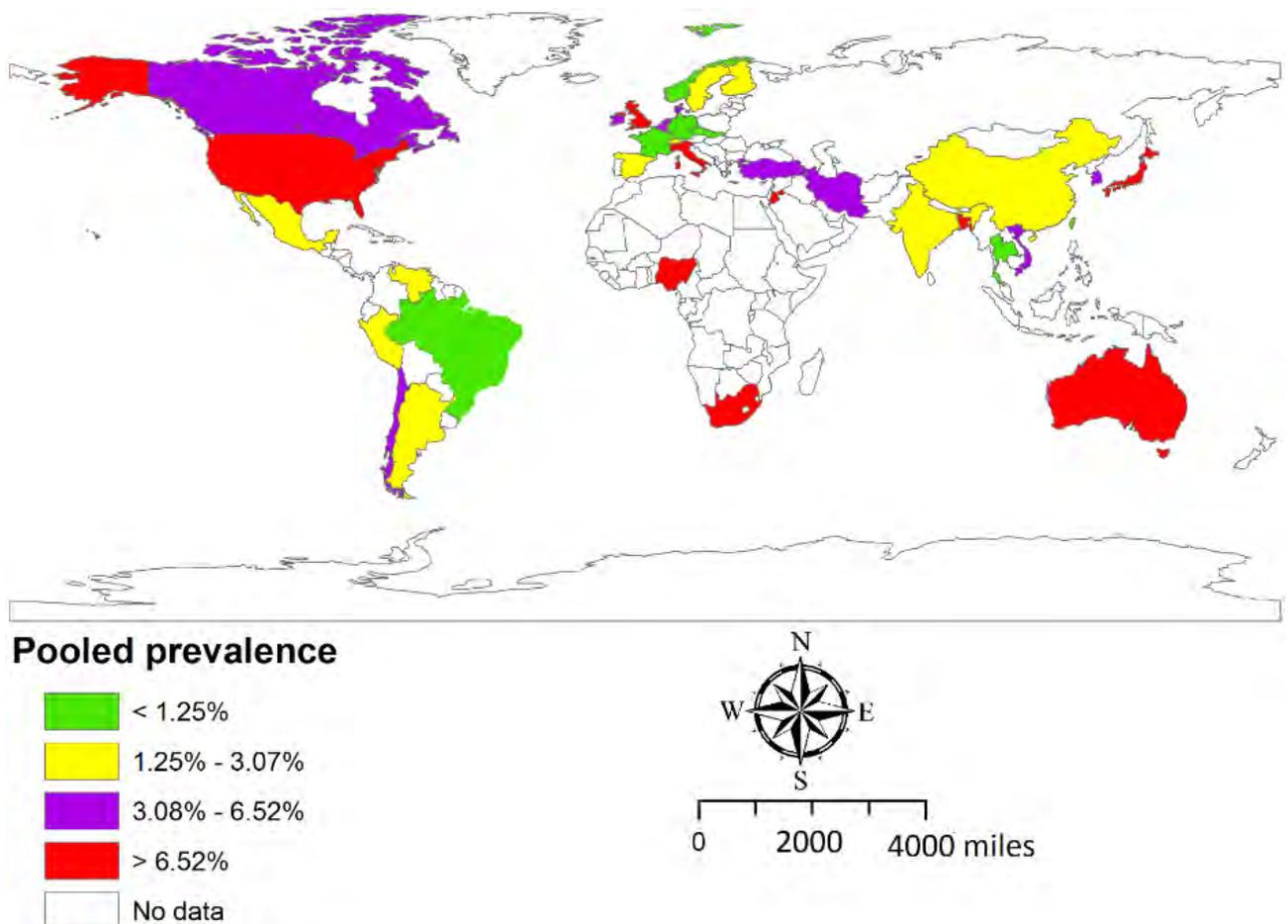


Figure 6 : Estimation de la prévalence de STEC O157 chez le bétail dans différents pays (Islam, 2014)

Cette analyse multivariée a mis en évidence d'autres facteurs de variation de la prévalence des STEC :

- Le type de bovins : le portage de STEC est significativement supérieur pour les vaches de boucherie élevées dans des parcs d'engraissement que pour les vaches laitières. Cette observation est également décrite dans une étude japonaise où les vaches de boucherie étaient significativement plus porteuses de STEC O157 que les vaches laitières. En revanche, le portage n'est pas significativement supérieur pour les STEC O26 (Sasaki, 2013).
- Le type de prélèvement : le taux de STEC détecté est significativement supérieur lorsque les fécès sont recueillis directement dans l'intestin, en raison d'une colonisation plus importante à cette section du tube digestif que dans les matières fécales.
- La technique utilisée : L'enrichissement avec inhibiteur semble plus adapté que l'enrichissement sans inhibiteur, qui reste plus performant que la culture sans enrichissement préalable pour l'isolement des STEC.

Aux Etats-Unis, une autre méta-analyse publiée en 2015 reprend des études publiées entre 2000 et 2013 sur le portage des STEC chez les bovins. La prévalence varie en fonction du type de bovin étudié, mais également de la saison, avec un portage plus important l'été que l'hiver. Les prévalences estimées sont de 10.68 % chez les bovins jeunes en parc d'engraissement, 4.65 % chez les vaches de boucherie et 1.79 % chez les vaches laitières.

Au niveau européen, en 2018, l'EDCD a repris les données de 6 états membres concernant les prélèvements réalisés sur les animaux pour évaluer le portage des STEC (1690 prélèvements). Le taux de portage total est estimé à 7,6 %. 1020 prélèvements concernent les bovins, avec des STEC isolés dans 32 prélèvements (3,1 %) dont 19 STEC O157 (1,9 %).

En Espagne, une étude de 2016 décrit un portage de souche de STEC de 10,1 % parmi les sérogroupes O157, O91, O26, O111, O103, O145, O113, O45, O121. (Cabal, 2016). En Ecosse, le portage de STEC O157 est estimé à 8,2 % sur 14856 prélèvements fécaux de bovins étudiés (Gunn, 2007).

En Suisse, un portage estimé à 3,1 % pour les sérogroupes O157, O26, O103, O111, O145 a été observé sur 573 échantillons fécaux de bovins étudiés (Hofer, 2011), tandis qu'en Belgique, un portage de 3,0 % de souches de sérogroupes O26, O103, O111, O145 est décrit sur 399 échantillons. (Joris, 2011).

Au niveau français, une étude a évalué le portage de STEC provenant de différents types de bovins à l'abattage sur un effectif de 1318 prélèvements fécaux (Bibbal 2015). La technique repose sur une PCR visant les gènes *stx1*, *stx2* et *eae*, et visant les sérogroupes O157, O26, O103, O111, O145. Une PCR visant les sous-types *eae* est réalisée en parallèle, le but étant d'être plus discriminant dans la détection des échantillons susceptibles de contenir une souche de STEC pathogène. En effet, les STEC sont majoritairement associés aux sous-types γ 1, β 1, ϵ , et θ , la détection de ces sous-types d'*eae* par PCR est davantage associée à l'isolement ultérieur d'une souche de STEC dans le prélèvement (Bibbal 2013). 235 échantillons (17,8 %) étaient positifs pour *stx*, un sous-type d'*eae*, et pour un des 5 sérogroupes recherchés. Parmi ces 235 échantillons, 96 souches ont été isolées dont 33 STEC présentant les facteurs de virulence *stx* et *eae*, appartenant aux sérotypes recherchés :

- O157:H7 (18 souches)
- O26:H11 (3 souches)
- O103:H2 (8 souches)
- O111:H8 (2 souches)
- O145:H28 (2 souches)

Des souches de STEC ont été isolées respectivement dans 4,5 %, 2,4 %, 1,8 % et 1,0 % des échantillons de jeunes taureaux, taureaux élevés pour la viande, vaches laitières et vaches de boucherie. Il est important de préciser qu'il existe une saisonnalité dans l'abattage des jeunes taureaux, et la plupart des prélèvements réalisés ici ont donc été réalisés l'été, saison où la prévalence des STEC est plus élevée, ce qui pourrait en partie expliquer ce portage plus fréquent pour cette catégorie d'animaux.

En tenant compte de la proportion des différents animaux consommés en France, la prévalence du portage des STEC de ces 5 sérotypes est évaluée à 1,8 % chez le bétail français à l'abattage, 1,2 % pour le sérotype O157 :H7.

I.2.2. Surveillance agroalimentaire

a- Contexte réglementaire

Au niveau national, depuis l'entrée en vigueur le 1^{er} janvier 2006 du « paquet hygiène » qui introduit les principes généraux de la législation agroalimentaire, les industriels doivent assurer le caractère sûr et sain de la denrée alimentaire commercialisée, afin de protéger la santé du consommateur.

Ces notions sont détaillées dans le règlement CE No 178/2002. Ils ont l'obligation de mettre en place, sous leur propre responsabilité, un plan de maîtrise sanitaire, afin de contrôler les risques potentiels.

La directive 2003/99/CE impose aux Etats membres de mettre en place une surveillance des zoonoses et agents zoonotiques, les STEC faisant partie de la liste des agents à surveiller dans cette directive.

En ce qui concerne la sûreté alimentaire, les critères microbiologiques, les règles d'hygiène ainsi que la gestion de non-conformités (retraits et rappels de lot) sont décrits dans le règlement CE No 2073/2005, ultérieurement modifié dans le règlement CE No 1441/2007. Aucun critère microbiologique concernant les STEC n'est décrit dans ce règlement, mais celui-ci rappelle l'avis du comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique (2003). Cet avis conclue que des recherches microbiologiques ciblant les STEC ne diminuent probablement pas le risque de contamination pour le consommateur car les STEC sont présents en petite quantité et de manière éparse dans les prélèvements. Cependant, ces recherches mais sont destinées à réduire la contamination fécale au stade de l'abattage à partir du tube digestif des ruminants, et ainsi réduire les risques concernant la santé publique. Cet avis identifie les aliments à risque, à savoir les viandes de bœuf crues, peu cuites, hachées et fermentées, ainsi que les produits au lait cru, les graines germées et les jus de fruits et légumes non pasteurisés.

Cependant, les gestionnaires de risques ont également besoin d'une définition d'une souche de STEC pathogène, ainsi que de la connaissance des techniques disponibles pour leur détection.

La surveillance des STEC se fait à la fois par des autocontrôles réalisés par les industriels produisant ces aliments à risque, et par la mise en place de contrôles officiels par la direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF). Ces contrôles officiels sont réalisés sans préavis, à n'importe quel stade de production, transformation et distribution des aliments.

Des mesures de gestion plus précises sont définies à l'échelle nationale pour les viandes hachées de bœuf, définies par la direction générale de l'alimentation (DGAL) en 2012 dans la note de service DGAL/SDSSA/N2012-8181, définissant la fréquence et l'échantillonnage recommandé :

- La recherche des STEC se fait sur 25 grammes d'échantillon de viande.
- La recherche de STEC O157 est réalisée systématiquement à chaque mêlée pour les viandes surgelées, et au moins une fois par semaine pour les viandes réfrigérées.
- La recherche des autres STEC hautement pathogènes est recommandée au moins une fois par semaine pour les viandes surgelées.

b- Définition des souches de STEC à surveiller

La situation est plus claire depuis la recommandation de l'AFSSA (ultérieurement remplacée par l'ANSES) datant d'avril 2006. Pour être considérée comme hautement pathogène, une souche de STEC doit appartenir aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et posséder deux facteurs de virulence : *stx1* ou *stx2*, et *eae*. En effet, le sérotype seul ne peut présager de la pathogénicité d'une souche.

La note de l'AFSSA de 2006 recommandait de rechercher à minima systématiquement les souches de sérotype O157:H7 possédant les gènes *stx1* ou *stx2* et *eae* pour des raisons épidémiologiques, et de rechercher idéalement les gènes *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx* ainsi que les sérogroupes O157:H7, O26, O91, O103, O111 et O145 tel que décrit dans le plan de surveillance du 7 mars 2005 relatif à la consommation de fromage au lait cru de chèvre.

Cette définition est amenée à évoluer en fonction des nouveaux déterminants caractérisés et en fonction des méthodes utilisées pour typer les STEC. L'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008

définit ainsi les « EHEC typiques majeurs », souches hautement pathogènes, selon les critères génétiques suivants:

- EHEC O157:H7 = rfbEO157, flicH7, stx1 et/ou stx2, eae-gamma
- EHEC O26:H11 = wzxO26, flicH11, stx1 et/ou stx2, eae-beta
- EHEC O145:H28 = ihp1O145, flicH28, stx1 et/ou stx2, eae-gamma
- EHEC O103:H2 = wzxO103, flicH2, stx1 et/ou stx2, eae-epsilon
- EHEC O111:H8 = wbd1O111, flicH8, stx1 et/ou stx2, eae-theta

Au niveau européen, en 2007, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) souligne l'absence de consensus concernant la stratégie de surveillance des STEC dans les aliments, et recommande une recherche initiale du sérotype O157 car majoritairement associé aux infections graves, puis étendue aux autres sérotypes, comme O26, O91, O103, O111 et O145.

c- Plans de surveillance agroalimentaire

Depuis 2005, la direction générale de l'alimentation (DGAL) a régulièrement mis en place des plans de surveillance de la contamination par des STEC des aliments à risque, à savoir les viandes hachées réfrigérées et surgelées de bœuf, les minerais de bœuf et les fromages à lait cru (vache, chèvre, brebis). Ces plans permettent d'estimer le taux de contamination des différentes denrées alimentaires, et d'identifier des facteurs de risques potentiels. Il est fait en sorte que l'échantillonnage soit le plus représentatif possible de la production et consommation : le nombre d'échantillons à prélever est proportionnel à la production. Les résultats de ces plans de surveillance sont communiqués par les agences d'évaluation des risques, l'ANSES en France et l'autorité européenne de sécurité des aliments en Europe (EFSA).

Lors des plans de surveillance des STEC dans les aliments, les analyses de première intention sont réalisées par un laboratoire agréé pour la réalisation des analyses officielles de recherche de STEC. En cas de positivité, les analyses sont confirmées par le laboratoire national de référence (LNR) qui est le laboratoire d'études des microorganismes alimentaires pathogènes (LMAP) situé sur le campus vétérinaire de Lyon.

La méthode utilisée est basée sur la méthode ISO TS 13 136 (2012) recommandée par l'EFSA. Après enrichissement de l'aliment investigué à l'aide d'un bouillon d'enrichissement afin d'améliorer la sensibilité, une analyse séquentielle par PCR en temps réel est réalisée :

Dans un premier temps, seuls les gènes *stx* et *eae* sont ciblés. En cas de double positivité, les gènes des cinq sérogroupes considérés hautement pathogènes (O157, O26, O103, O111 et O145) sont recherchés.

Lorsqu'un sérotype est retrouvé, une étape d'isolement de la souche par culture est entreprise, afin de faire une caractérisation génotypique et phénotypique de la souche, afin de confirmer que la souche sérotypée est bien celle porteuse des facteurs de virulence.

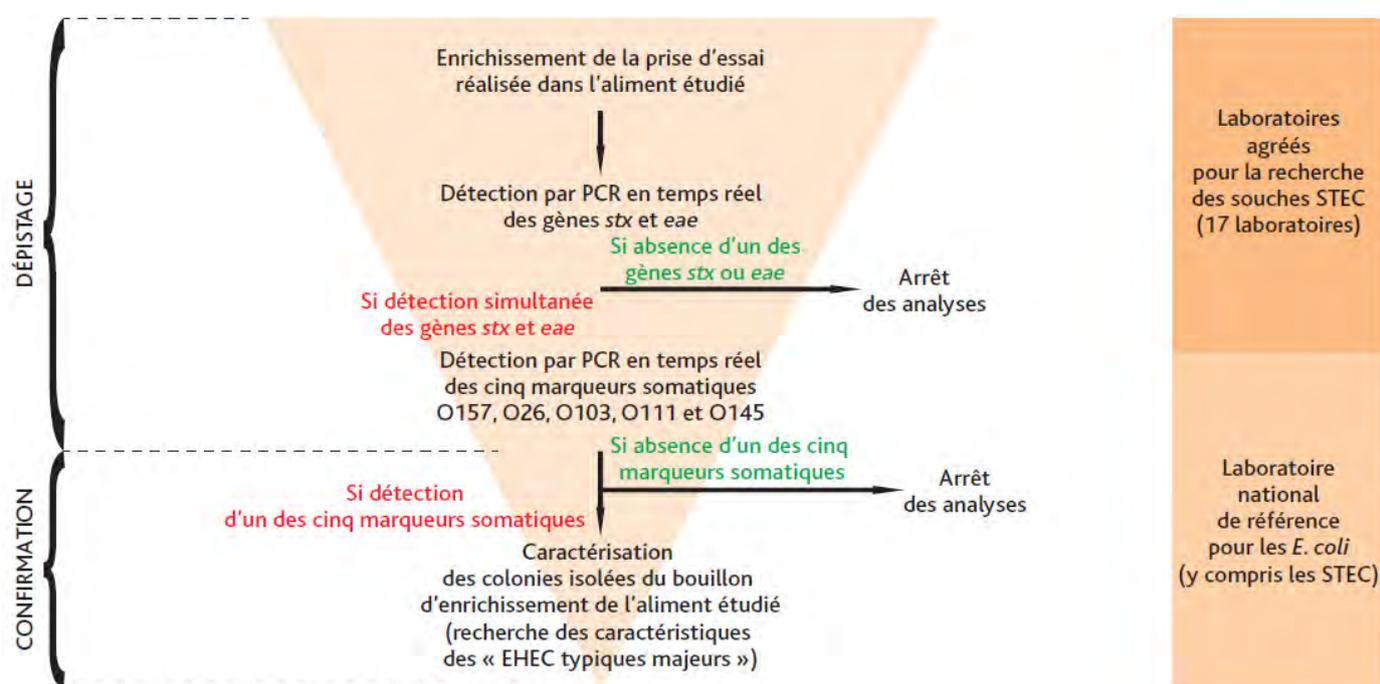


Figure 7 : Schéma des principales étapes de la méthode de recherche des souches STEC hautement pathogènes et acteurs impliqués au cours des plans de surveillance annuels, issu de « Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011) » (E. Loukiadis)

Lors du plan de surveillance de 2018, 604 échantillons ont été prélevés.

Sur les 604 prélèvements prélevés, 599 ont été analysés :

- 538 échantillons (89,8 %) étaient négatifs pour les deux gènes *stx* et *eae*.
- 35 échantillons (5,8 %) étaient positifs pour *stx* mais négatifs pour *eae*.
- 16 échantillons (2,7 %) étaient positifs pour *eae* mais négatifs pour *stx*.
- 10 échantillons (1,7 %) étaient positifs pour *stx* et *eae*.

Parmi ces 10 échantillons, les sérogroupes ont été recherchés par PCR. En plus des sérogroupes hautement pathogènes, 3 autres sérogroupes ont été recherchés : les sérogroupes O45 et O121 en raison des dispositions prévues aux États-Unis par le Food Safety and Inspection Service (FSIS) ainsi que le séro groupe O80 en raison d'une recrudescence du nombre de SHU associé à O80 en France.

Huit de ces 10 échantillons (soit 1,3 % des échantillons totaux) ont eu une PCR positive pour au moins un séro groupe : O145 (4 échantillons), O26 (2), O103(2), O45(1).

Parmi ces 8 échantillons, seules 3 souches de STEC (soit 0,5 % des échantillons) ont pu être isolées du bouillon d'enrichissement, deux souches O26 et une souche O145. Ces souches montraient des résultats positifs en PCR à la fois pour les gènes *stx* et *eae*, et pour un des sérogroupes testés.

Le taux de contamination au cours de ces plans de surveillance est stable depuis dix ans, variant de 0 à 0,5 % (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats des plans de surveillance concernant la recherche de STEC dans les viandes hachées de bœuf de 2009 à 2018.

Issu du bilan 2018 des plans de surveillance et de contrôle de la surveillance sanitaire des denrées animales et végétales en France

Année du plan	Matrice(s)	Stade de prélèvement	Nombre de prélèvements exploitables	Taux de contamination (IC ₉₅)	Souches STEC isolées
2018	VHR + VHS	D	589	0,5% (IC ₉₅ - [0,2-1,5 %])	O26:H11 (n=2) O145 :H28 (n=1)
2017	VHS	P	595	0,0 % (IC ₉₅ -[0,0-0,6 %])	-
2016	VHR + VHS	D	876	0,3 % (IC ₉₅ -[0,1-1,0 %])	O26:H11 (n=3)
2015	VHR	D	295	0,3 % (IC ₉₅ -[0,1-1,9 %])	O103:H2 (n=1)
2013	VHR + VHS	P	500	0,4 % (IC ₉₅ -[0,1-1,4 %])	O157:H7 (n=1) O26:H11 (n=1)
2012	VHS	P	1922	0,4 % (IC ₉₅ -[0,1-0,7 %])	O157:H7 (n=3) O26:H11 (n=2) O103:H2 (n=2)
2011	VHS	P	1878	0,5 % (IC ₉₅ -[0,2-0,9 %])	O26:H11 (n=5) O157:H7 (n=3) O103:H2 (n=1)
2010	VHR	D	2476	0,2 % (IC ₉₅ -[0,1-0,5 %])	O26:H11 (n=4) O157:H7 (n=1) O145:H28 (n=1)
2009	VHR	D	1527	0,1 % (IC ₉₅ -[0,0-0,5 %])	O103:H2 (n=1)

VHS : viandes hachées de bœuf surgelées – VHR : viandes hachées de bœuf réfrigérées - P : production – D : distribution

En ce qui concerne la recherche de STEC dans les fromages à lait cru, 490 échantillons ont été analysés avec la même méthode en 2018. Parmi ces 490 échantillons, 63 étaient positifs pour *stx* et *eae*, 43 échantillons (8,8 %) présentaient un résultat positif lors de la recherche des sérogroupes, mais seules 4 souches ont pu être isolées et typées à partir du bouillon d'enrichissement, soit un taux de contamination affirmé de 0,8 %.

Au niveau européen, le système de surveillance FWD (Food and Waterborne Diseases and Zoonoses) a été mis en place en 2007, coordonné par l'ECDC et l'EFSA.

En 2018, 20424 aliments de différents types ont été analysés, avec un taux de contamination global estimé à 2,4 % : un total de 3,6 % des prélèvements de viande bovine étaient contaminés, et la viande de mouton, de chèvre, et de cerf apparaissent comme des sources importantes de STEC (Tableau 3).

Tableau 3 : Fréquence de STEC isolés selon le type d'aliments, issu de The European Union One Health 2018 Zoonoses Report (EFSA, 2019)

Food category ^(a)	Samples tested by ISO 13136	Samples positive for											
		any STEC		O157		O26		O145		O103		O111	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bovine meat	5,453	194	3.6	8	0.15	6	0.11	1	0.02	3	0.06	0	0
Ovine and goat meat	711	77	10.8	4	0.56	2	0.28	4	0.56	5	0.70	0	0
Other ruminants meat ^(b)	185	33	17.8	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0
Pig meat	1,100	37	3.4	3	0.27	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0
Other meat ^(c)	1,371	26	1.9	1	0.07	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0
Mixed meat	514	8	1.6	1	0.19	0	0.00	1	0.19	1	0.19	0	0
Milk and dairy products ^(d)	3,576	27	0.8	2	0.06	0	0.00	0	0.00	1	0.03	0	0
Raw milk ^(e)	1,719	73	4.2	4	0.23	1	0.06	2	0.12	2	0.12	0	0
Fruit and vegetable seeds ^(f)	3,300	2	0.1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0
Other food	1,375	3	0.3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0
Total	20,424	485	2.4	24	0.12	9	0.04	8	0.04	12	0.06	0	0

d- Gestion des alertes

Tout aliment contaminé par un STEC dit hautement pathogène doit être considéré comme préjudiciable pour la santé humaine. En cas de détection d'une telle souche dans un aliment, des mesures de retrait et rappel peuvent être engagées sans attendre la confirmation par le laboratoire national de référence. Lorsque le résultat est confirmé par le laboratoire national de référence, les lots concernés doivent être retirés et rappelés et des prélèvements complémentaires doivent être effectués pour évaluer l'ampleur de la contamination et identifier tous les lots susceptibles d'être contaminés.

I.3- Epidémiologie des STEC chez l'homme

I.3.1. Historique des épidémies à STEC

a- Au niveau international

Il est assez courant de qualifier les STEC de pathogènes émergents. Les premières évocations de SHU remontent à 1955, et les premières épidémies de STEC aux années 1980. Une des causes possible est le changement des habitudes alimentaires, avec une plus grande part des repas pris hors du domicile, ainsi qu'une cuisson moindre de certains aliments dont la viande de boeuf.

En 1982, la première épidémie liée aux STEC a été décrite aux Etats-Unis, dans l'Oregon puis le Michigan, après consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide, d'où le nom populaire de « maladie du hamburger » repris par la presse. 47 personnes ont été atteintes et 70 % ont nécessité une hospitalisation. Des analyses sur 12 selles de patients et sur de la viande provenant du lot incriminé ont mis en évidence une souche de *E. coli* de sérotype O157:H7. L'année suivante, les STEC ont été retenus comme étiologie possible de colite hémorragique et de SHU (Karmali, 1983).

Deux autres épidémies liées à la consommation de viande hachée ont été signalées en 1993 à Washington faisant 501 malades, 45 SHU et 3 décès, puis en 1996 en Ecosse, faisant 512 malades dont 17 décès.

En 1996, Une épidémie de 9451 infections entraînant 16 décès est déclarée au Japon, suite à la consommation de graines de radis germées.

En 2000, dans la ville de Walkerton au Canada, qui se situe dans une zone d'élevage intensif, une épidémie d'infection à *E.coli* O157 :H7 a fait 2000 cas, dont 27 SHU et 7 décès. L'eau du réseau de la ville a été incriminée, un puit ayant été contaminé par l'épandage de fumier de bovin sur des champs voisins.

Ces épidémies étant dues à *E.coli* O157, les travaux de recherche ont été ciblés principalement sur ce sérotype, d'où le manque de données sur les autres sérotypes à cette période.

En Allemagne en 2011, une épidémie de STEC a entraîné 4320 infections documentées dont 850 cas de SHU (22 %) et 82 décès (Frank, 2011). Le profil des patients touchés est atypique, avec 88 % d'adultes. L'incubation moyenne était de 8 jours, contre 3 à 4 jours pour les infections à EHEC classiquement. L'aliment incriminé était un lot de graines de fenugrec germées. La souche responsable de cette épidémie était le sérotype O104:H4, et portait à la fois les facteurs de virulence des STEC (gène stx2), le facteur d'adhésion des EAEC (aggr+) et des facteurs de virulence des ExPEC (HPI, aérobactine) à l'origine de sa forte virulence. De plus, cette souche avait acquis une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) portée par un plasmide de type CTX-M.

b- En France

En France, la première TIAC due aux STEC remonte à 2000, et était liée à la consommation de merguez peu cuites. En 2003, une TIAC liée à O148 :H8 a fait suite à la consommation de viande de mouton originaire d'un élevage familial.

En 2005 ont eu lieu deux épidémies de STEC et ont chacune été responsables de 17 cas de SHU. La première était due à des souches O26 et O80 contenues dans des camemberts au lait cru et la seconde à des STEC O157 :H7 contenues dans de la viande hachée surgelée de bœuf.

Une autre épidémie consécutive à la consommation de steaks hachés de bœuf contenant une souche de STEC O157:H7 a eu lieu dans le Nord de la France en juin 2011, et a causé 18 cas de SHU (King, 2014).

Récemment, en 2018, trois investigations suite à des épidémies à STEC ont eu lieu en France, toutes les trois permettant d'identifier comme source de contamination la consommation de reblochons au lait cru, issus de différents producteurs, entraînant la mise en place de retraits de lots. Deux épidémies étaient dues à des souches de sérotype O26, la troisième à une souche O80.

I.3.2. Surveillance des infections à STEC en France

a- Activité du CNR

Le Centre National de Référence des *Escherichia coli* est situé à l'institut Pasteur à Paris. La surveillance repose sur des techniques de PCR réalisées sur selles ciblant :

- les facteurs de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehxA*
- les gènes codant pour 10 sérogroupes de STEC fréquemment observés en France chez les cas de SHU pédiatriques (O157, O121, O26, O103, O91, O145, O55, O111, O104 et O80).

En parallèle, les souches sont isolées et caractérisées (facteurs de virulence et sérogroupage). Un séquençage complet du génome est réalisé sur les souches, permettant la recherche étendue de tous les facteurs de virulence et la caractérisation des différents variants pour certains facteurs de virulence : *stx2* (*stx2a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* ou *g*), *eae* (*eae* β , ϵ , γ , ζ , ϑ , ξ). Le séquençage permet aussi la comparaison génomique à la recherche de clusters épidémiques, en y incluant les souches alimentaires issues des alertes vétérinaires. Le rapport d'activité annuel de 2019 donne les résultats de l'année 2018, au cours de laquelle 1041 selles ont été envoyées au CNR, toute symptomatologie confondue.

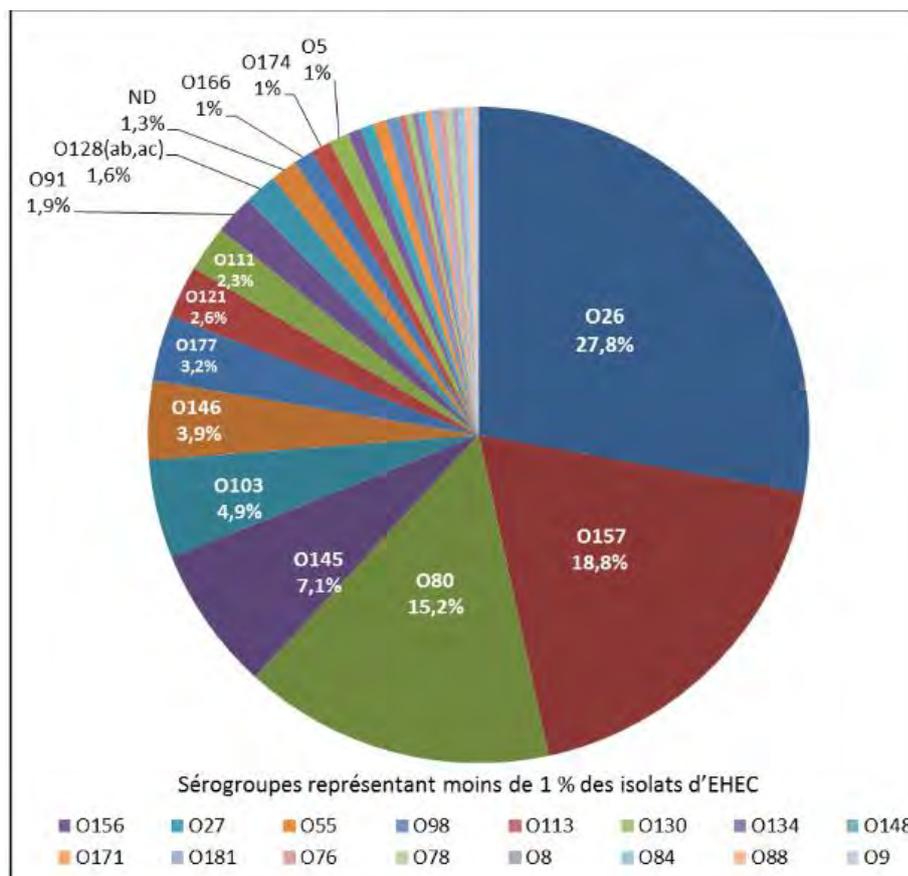


Figure 8 : Répartition des sérogroupes de STEC toute symptomatologie confondue en 2018, rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR *E.coli*

Parmi ces prélèvements, 309 associaient une PCR *stx* et une culture positives, alors que 250 selles avaient une PCR *stx* positive et une culture négative. Les 309 souches isolées ont été sérotypées. Les sérogroupes principaux retrouvés sont O26 (27,8 %), O157 (18,8 %) et O80 (15,2 %).

De plus, le rapport donne la répartition des sérogroupes obtenus pour les patients atteints de SHU, tout âge confondu représentant 126 prélèvements étudiés. Le séroroupe le plus fréquemment retrouvé est O26 (37,3 %), suivi cette fois par O80 (23,8 %) et O157 (11,1 %).

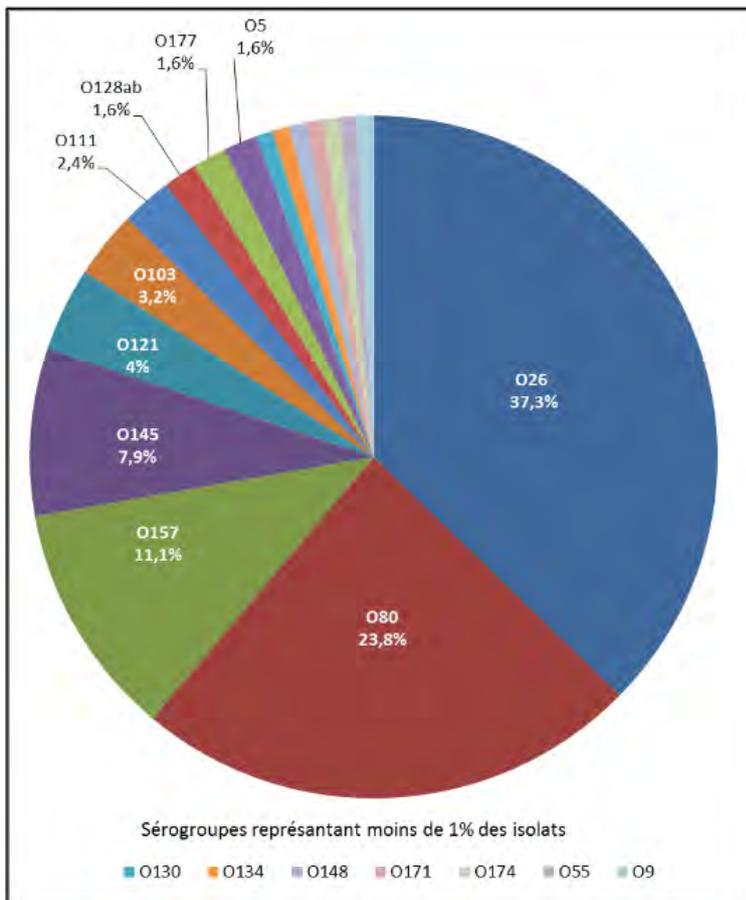


Figure 9 : Répartition des sérogroupes de STEC détectés chez les patients souffrant de SHU en 2018, rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR *E.coli*

b- Notification des cas groupés d'infections à STEC

En France, une infection liée au STEC n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, en dehors des contextes de toxi-infection alimentaire collective (TIAC).

Les cas de SHU sporadiques notifiés à Santé publique France ne font pas l'objet d'investigations épidémiologiques systématiques visant à identifier la source de

contamination, en raison des multiples modes de contamination possibles. Une investigation est mise en œuvre si des cas de SHU ou d'infection à STEC groupés dans le temps ou dans l'espace sont signalés. Elle a pour objet de décrire les cas et rechercher une source commune de contamination.

Une situation de cas groupés de SHU ou d'infections à EHEC est suspectée devant :

- Au moins deux cas de SHU dans un délai d'un mois dans la même famille ou collectivité, ou dans toute situation commune
- Un cas de SHU associé à des cas de diarrhées dans l'entourage dans les 15 jours précédant le SHU

c- Notification des cas de SHU pédiatriques

Depuis 1996, la surveillance du SHU pédiatrique repose en France sur un réseau hospitalier de 32 services de néphrologie pédiatrique volontaires répartis sur le territoire métropolitain. D'autres services hospitaliers notifient ponctuellement des cas de SHU pédiatriques. Depuis la mise en place de cette surveillance, l'incidence annuelle du SHU chez l'enfant de moins de 15 ans reste stable en France, inférieure à 1/100 000. Les cas sont notifiés à Santé Publique France, et la confirmation microbiologique est réalisée au CNR.

A la mise en place de cette surveillance, le sérotype O157 était prédominant dans les souches testées : Entre 1996 et 2006, le sérotype O157 représentait 83 % des souches typées, contre respectivement 6, 3, 2 et 1 % pour O26, O103, O145 et O111. De même que pour la surveillance agroalimentaire, l'absence de technique de détection des souches non-O157 peut en partie expliquer la sous-estimation de ces souches sur cette période.

Une étude épidémiologique nationale menée en 2000 et 2001 a mis en évidence certains facteurs de risque de survenue du SHU chez l'enfant de moins de 15 ans, à savoir la consommation de steak haché peu cuit, et le contact dans la famille ou la collectivité fréquentée avec un cas présentant des diarrhées dans les 7 jours (V. Vaillant, Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques. Etude cas-témoins nationale 2000-2001, Institut de veille sanitaire).

Un état des lieux des souches responsables de SHU en France a été réalisé entre 2007 et 2016, où 942 selles ont été étudiées (Bruyand, 2019). Parmi ces selles, 496 souches ont pu

être isolées et sérogroupées. Sur l'ensemble des selles, les sérogroupes retrouvés majoritairement étaient les suivants :

- O157 (23 % des selles)
- O26 (11 %)
- O80 (8 %)
- O111 (2 %)
- O145 et O55 (1,5 % des selles)

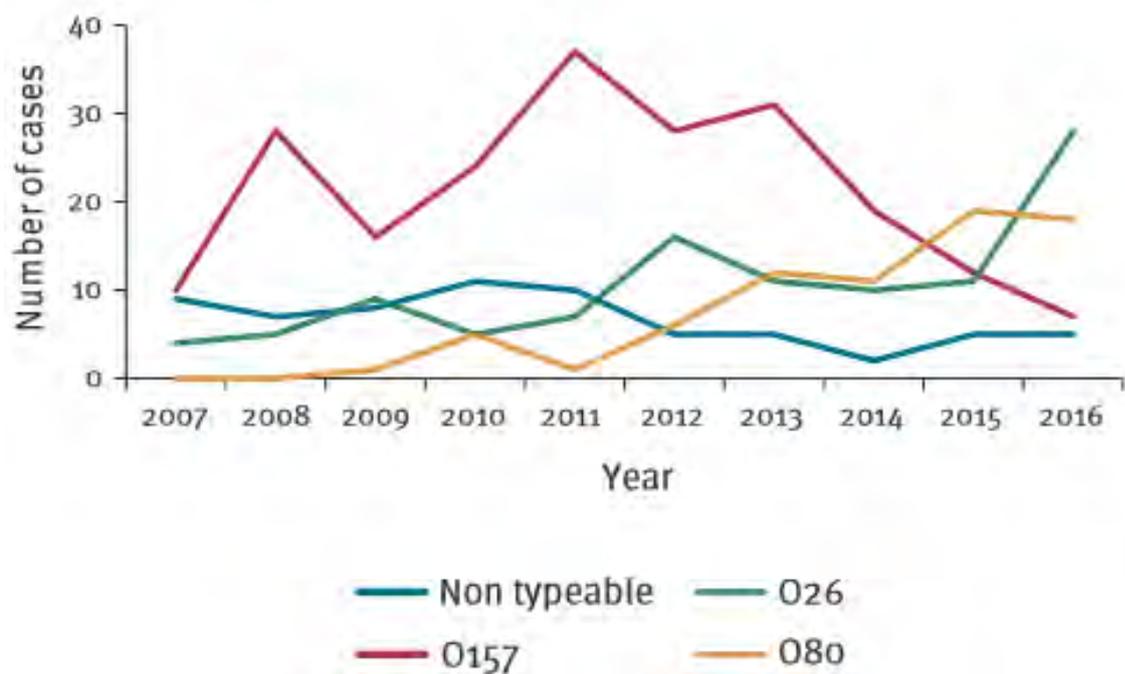


Figure 10: Principaux sérogroupes de STEC isolés dans les selles d'enfants atteints de SHU en France entre 2007 et 2016 (Bruyand, 2019)

Parmi ces 942 cas de SHU, 96 % étaient des cas sporadiques, et 51 % des cas sont survenus entre juin et septembre.

Depuis les années 2010, la part de STEC appartenant au sérotype O157 a tendance à régresser, au profit de STEC non-O157, avec en particulier deux sérogroupes émergents, O26 et O80.

De plus, les patients présentant un SHU à STEC O80 rapporteraient moins de consommation de viande de bœuf que ceux présentant un SHU à STEC O157, et moins de contact avec des patients ayant eu des diarrhées ou un SHU que les patients infectés par d'autres

sérogroupe de STEC, ce qui laisse supposer d'autres réservoirs et modes de contamination (Ingelbeen, 2018).

En 2018, 133 cas de SHU pédiatriques ont été notifiés à Santé Publique France avec des prélèvements adressés au CNR. 94 sérotypes ont pu être détectés, et les sérogroupe O26 et O80 étaient davantage représentés que O157. (Tableau 4)

Tableau 4 : Distribution des sérogroupe de STEC chez les 133 cas de SHU pédiatriques notifiés en France en 2018, issu de SPF

Sérogroupe*	Total N	% des cas
O26	41	30,8
O80	18	13,5
O157	10	7,5
O145	9	6,8
O111	4	3,0
O55	3	2,3
O121	3	2,3
O103	3	2,3
O177	2	1,5
O80-O26	1	0,8
Présence de gènes <i>stx</i> dans les selles sans sérogroupe identifié	19	14,3
PCR <i>stx</i> négative	20	15,0
Total	133	100

En ce qui concerne les profils de virulence, 89 % des souches caractérisées responsables de SHU portaient les facteurs de virulence *stx2* et *eae* avec ou sans autres facteurs de virulence.

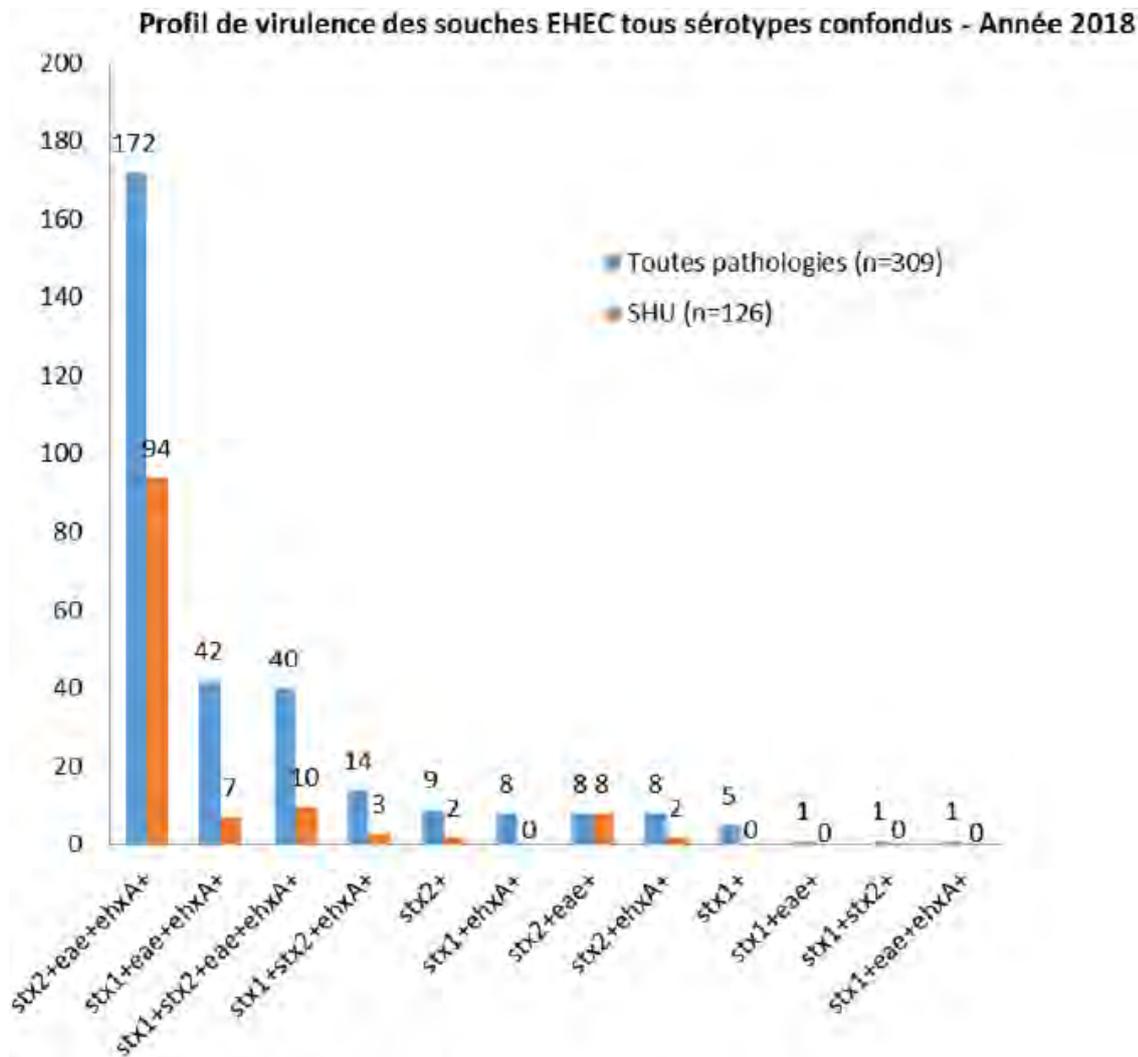


Figure 11 : Profil de virulence des souches EHEC tous sérotypes confondus - rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 -CNR *E.coli*

I.3.3. Surveillance des infections à STEC dans le monde

En Europe, la surveillance des cas de STEC est coordonnée par l'ECDC et l'EFSA, par le biais du réseau de surveillance FWD (Food and Waterborne Diseases and Zoonoses).

En 2018, 8314 cas d'infection à STEC ont été déclarés, toutes formes cliniques confondues. L'incidence des infections à STEC était de 2,28 cas pour 100 000 habitants, soit 39 % de plus qu'en 2017, les taux étant stables entre 2014 et 2017.

Les pays ayant déclaré le plus de cas sont l'Irlande, la Suède, Malte et le Danemark, avec des incidences respectives de 20,0 ; 8,8 ; 8,6 et 8,4 cas pour 100 000 habitants. Cependant, les systèmes de déclaration des infections sont variables selon les pays.

Aux Etats-Unis, une surveillance des cas de toxi-infections alimentaires est coordonnée par le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC), à travers un programme scientifique établi en 1995 appelé « foodborne Diseases Active Surveillance Network », en collaboration avec la FDA (Food and Drug Administration). Le rapport de 2015 fait état de 465 cas liés à O157:H7 (incidence de 0,95/100000 habitants) et 807 cas associés à des souches non-O157 (incidence de 1,65/100000 habitants).

PROBLEMATIQUE

L'objet de cette étude est de mettre en place une technique de PCR en temps réel ciblant les principaux sérogroupes de STEC décrits comme responsables d'infections, sur des échantillons de selles détectés positifs pour *stx1* et/ou *stx2*, particulièrement lors de la survenue de SHU.

Pour cela, nous avons dans un premier temps validé la méthode de PCR en contaminant des selles par des souches de référence de STEC tout en regardant la concordance entre le nombre de cycles de PCR obtenus pour la détection des shigatoxines et des sérogroupes.

Dans un second temps, nous avons réalisé la PCR sérogroupage sur l'ensemble des selles détectées positives pour *stx1* ou *stx2* dans notre laboratoire entre juillet 2018 et juillet 2020. Par extrapolation, nous avons essayé de relier ces résultats obtenus (Ct des shigatoxines et des sérogroupes) afin de caractériser les souches de STEC circulantes. Nous avons alors comparé les résultats de notre enquête épidémiologique aux données du CNR.

Partie II/ Etat des lieux au CHU de Toulouse

II.1- Matériel et méthodes

II.1.1. Sélection des échantillons

Au CHU de Toulouse, la prise en charge des échantillons de selles a été modifiée au cours de l'été 2018. La coproculture standard a été remplacée par une PCR multiplex visant les principaux agents bactériens responsables de diarrhées communautaires. Il s'agit de la trousse Amplidiag Bacterial GE^R commercialisé par Mobidiag^R qui détecte :

- *Campylobacter coli* et *C. jejuni* en ciblant *rumB* et *gyrB*
- *Salmonella* en ciblant *invA*
- *Shigella*/EIEC en ciblant *ipaH* et *invE*
- *Yersinia* pathogènes en ciblant *virF* et *gyrB*
- STEC en ciblant *stx1* et *stx2*
- ETEC en ciblant *est* et *ebt*
- EPEC en ciblant *eae*
- EAEC en ciblant *aggR*

En ce qui concerne la détection des STEC par cette PCR multiplex Mobidiag^R, une étude multicentrique déclarait une sensibilité et une spécificité à 100 % sur 1360 échantillons de patients (Kirveskari J et al. 2015).

Nous avons sélectionné toutes les selles positives en PCR pour *stx1* ou *stx2*, quel que soit leur service d'origine et l'âge du patient, sur la période juillet 2018 – juillet 2020.

Sur cette période, 8641 selles ont été prélevées au CHU de Toulouse. Parmi ces échantillons, une ou plusieurs bactéries ciblées par Mobidiag^R ont été détectées dans 4513 échantillons. Les EPEC sont les plus représentés (774 soit 17,2 %), suivi de *Campylobacter* (567 soit 12,6 %), puis des STEC (261 soit 5,8 %). Parmi ces 261 selles positives pour *stx1* et/ou *stx2*, soit 3 % des selles globales, nous avons pu récupérer 190 échantillons.

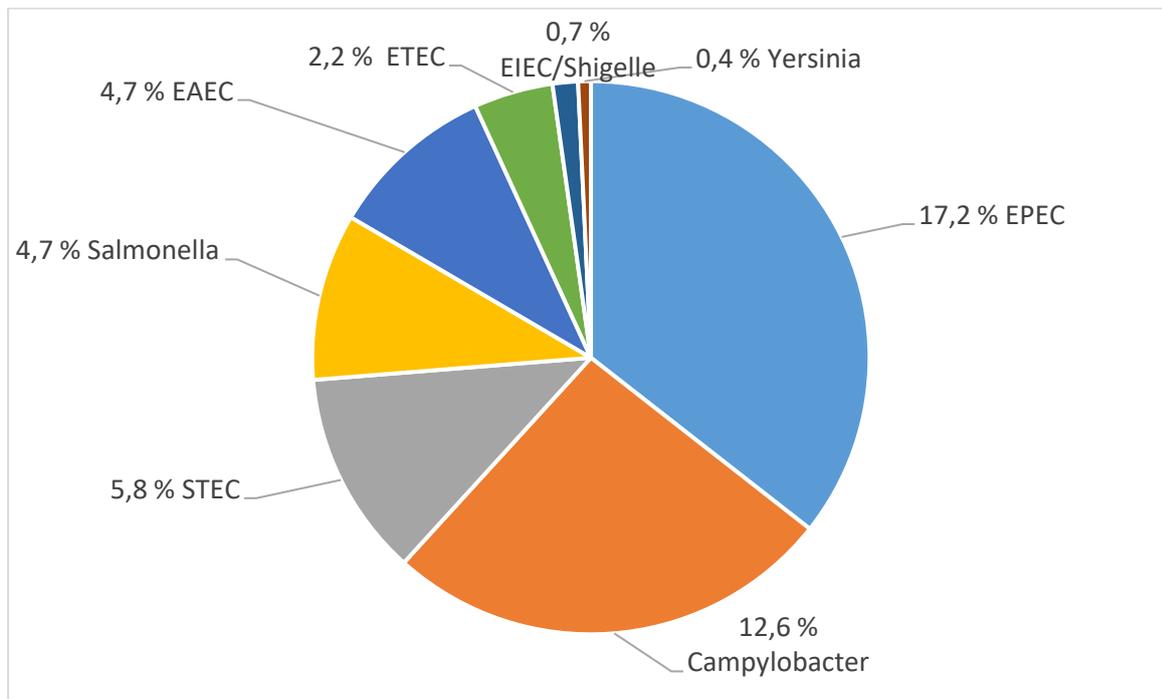


Figure 12 : Diagramme des pathogènes intestinaux retrouvés par la PCR Mobidiag[®] dans les selles de patients au CHU de Toulouse entre juillet 2018 et juillet 2020.

Il est important de souligner qu'obtenir simultanément dans une selle des PCR positives pour les shigatoxines et pour un sérotype n'assure pas que la souche du sérotype détecté soit toxigène. En raison de la grande variété bactérienne au sein des matières fécales, la présence simultanée d'une souche toxigène et d'une souche d'un des sérotypes ciblé est possible. Le seul moyen pour affirmer que le sérotype retrouvé est celui de la souche toxigène est d'isoler en culture la souche et de réaliser sur celle-ci les différentes PCR.

Les prélèvements de selles étant polymicrobiens, il est difficile d'isoler une souche sur des selles. Une détection de *stx1* ou *stx2* avec un Ct bas laisse supposer un inoculum important de la souche toxigène. Pour cette raison, seules les selles présentant un Ct bas (<25) pour *stx1* ou *stx2* ou celles des patients ayant un SHU ont étéensemencées afin d'essayer d'isoler la souche.

Ainsi, notre travail a été réalisé sur 190 prélèvements fécaux et 17 souches isolées.

II.1.2. Mise en place de la technique de PCR

La technique a été mise en place en PCR en temps réel sur le Light Cycler 480 de Roche^R, en plaques de 96 puits.

a- Choix des sondes et amorces

En ce qui concerne le choix des sérogroupes ciblés, nous nous sommes basés sur différentes références :

- Les sérogroupes O157, O26, O111, O145 et O103 sont décrits comme hautement pathogènes dans l'avis de l'AFSSA du 15 juillet 2008. Les séquences d'intérêt sont celles décrites par Perelle (2004) et utilisées dans la méthode ISO TS 13 136 (2012) recommandée par l'EFSA pour la détection des STEC dans les aliments.
- Gould et al. (2013), décrivent les sérogroupes O121 et O45 comme représentant respectivement 6 et 5 % des sérogroupes non O157 aux Etats-Unis entre 2000 et 2010.
- Le séroroupe O80 apparait comme le troisième plus fréquemment impliqué dans les SHU infantiles lors du dernier rapport annuel d'activité du CNR *E.coli* (Rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, Shigella et Salmonella, Institut Pasteur, 2019).

Les cibles et séquences des amorces et sondes utilisées, ainsi que les fluorochromes associés, sont décrits dans la procédure qui se trouve dans l'Annexe 1. Les sondes utilisées sont des sondes Taqman^R, avec des fluorochromes en 5' (reverser) qui émettent à des longueurs d'ondes différentes (6-FAM, Cy5^R et HEX) dans le but de réaliser des PCR multiplex.

b- Préparation des échantillons

En routine, pour réaliser la PCR Mobidiag^R utilisée au laboratoire, les selles des patients, reçues sous forme d'écouvillon fécal (Fecal Transwab[®] Milieu Cary Blair 2mL), sont extraites par une technique automatisée sur MagNa Pure 96^R.

Dans un premier temps, pour valider la méthode, des prélèvements de selles négatives en Mobidiag^R ont été récupérés, afin d'y inoculer une quantité connue de bactéries provenant de souches de référence de STEC de différents sérogroupes visés, fournies par l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD, U1220 INSERM INRA ENVT UPS).

Les souches ont été diluées dans du NaCl 0,85 % afin d'obtenir un trouble évalué à 0,5McFarland. 200µL de cette solution ont été ajoutés à 200µL de prélèvement d'une selle négative en Mobidiag^R. Ce mélange a été extrait sur l'automate MagNa Pure 96^R puis analysé par la PCR Mobidiag^R et par les PCR visant les sérogroupes.

Par la suite, cette même manipulation a été reproduite avec des souches de STEC isolées de selles de patients. Ces souches de STEC ont été isolées après ensemencement sur géloses chromogènes CPS, qui permettent de faciliter la détection des *E.coli* (ils apparaissent rose au sein des entérobactéries), puis repiquage sur BCP (meilleure visualisation des morphotypes de *E.coli*). Une PCR Mobidiag^R a alors été lancée sur les colonies d'*E.coli* d'aspects différents, afin d'isoler la souche toxigène.

Le but de cette manipulation est d'estimer le lien entre le nombre de cycles de PCR obtenus lors de la PCR multiplex visant les sérogroupes, et le nombre de cycles de PCR obtenus pour *stx1*, *stx2* et/ou *eae*, pour des souches caractérisées. Dans un second temps, l'objectif est de pouvoir extrapoler ce lien à une PCR réalisée directement sur selles de patients. Ce lien permettrait alors de mettre en évidence une association entre un facteur de virulence et un sérotype détecté en s'affranchissant de l'isolement de la souche en culture, et ainsi de supposer que la souche du sérotype visé est toxigène.

Dans un second temps, la PCR visant les sérogroupes a été réalisée sur les selles des patients étudiés. Nous avons récupéré les extraits de selles passés sur technique automatisée sur MagNa Pure 96^R. Aucune préparation supplémentaire n'était nécessaire.

En parallèle de ces patients, des témoins ont également été passés sur la PCR. 30 selles de patients de moins de 16 ans et 30 selles de patients de plus de 16 ans, toutes négatives en Mobidiag^R ont été passées sur la PCR multiplex visant les sérogroupes.

En ce qui concerne les contrôles, les contrôles positifs étaient des souches des sérogroupes ciblés fournies et sérotypées par l'IRSD. Pour les contrôles négatifs, de l'eau de qualité adaptée à la biologie moléculaire était utilisée.

c- Préparation des mix

Les amorces et sondes ont été reçues lyophilisées.

Une fois reconstituées à 100µM, les amorces sont diluées au cinquième, pour obtenir une solution à 20µM conservable 3 ans à -20°C.

Les sondes sont également diluées au cinquième pour obtenir des solutions à 20µM conservables 1 an à -20°C. Cependant, elles seront diluées à nouveau au dixième pour être utilisées pour la PCR à une concentration de 2µM, mais sont conservables seulement 3 semaines à -20°C à cette concentration.

La composition des mix de PCR est détaillée dans la procédure qui se trouve dans l'Annexe 1. Dans chaque puit de la plaque de PCR, 20µL du mix souhaité est ajouté, puis 5µL d'extrait de selle ou de suspension bactérienne est ajouté en suivant le plan de plaque préparé.

d- Choix des programmes de PCR

Le programme de PCR utilisé par Perelle (2004) est le suivant :

- Mise en température: 50°C pendant 2 minutes
- Dénaturation initiale: 95°C pendant 10 minutes
- Amplification (40 cycles): 95°C pendant 10 secondes puis 60°C pendant 30 secondes
- Refroidissement: 40°C pendant 30 secondes

Nous avons utilisé ce programme de PCR pour les sérogroupes O26, O157, O111, O121, O145, O80 et O45.

Toutefois, la détection n'était pas satisfaisante pour O103 car la température d'hybridation (T_m) de la sonde était plus basse avec une valeur à 48°C contre 52,9 à 59,2°C pour les autres sondes. Après différents essais, le programme retenu pour O103 est le suivant :

- Mise en température: 50°C pendant 2 minutes
- Dénaturation initiale: 95°C pendant 10 minutes
- Amplification (40 cycles): 95°C pendant 10 secondes puis 55°C pendant 30 secondes
- Refroidissement: 40°C pendant 30 secondes

Les différentes PCR réalisées étaient :

- Une PCR duplex ciblant O157 et O26
- Une PCR duplex ciblant O80 et O145
- Une PCR duplex ciblant O121 et O45
- Une PCR simplex ciblant O111
- Une PCR simplex O103, distincte des autres en raison du programme différent.

e- Performances de la méthode

Dans l'étude de Perelle (2004), la sensibilité de la PCR visant les sérogroupes O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 et O157 est testée à l'aide de plasmides recombinants contenant les séquences nucléotidiques d'intérêt, à des concentrations variant de 1 à 10⁸ copies par tube de PCR. La limite de détection est de 1 à 25 copies selon le sérotype ciblé. La sensibilité variait de 94 à 99,6 % pour les gènes que nous ciblons.

Tableau 5: Sensibilité des PCR ciblant des sérogroupes O26, O103, O111, O145 et O157, d'après Perelle (2004) et Perelle (2005).

Gène ciblé en PCR	Sensibilité
<i>wbdI</i> (O111)	94.0 %
<i>rfbE</i> (O157)	94.2 %
<i>wzx</i> (O26)	97.7 %
<i>wzx</i> (O103)	97,8 %
<i>ihp1</i> (O145)	99,6 %

II.2- Résultats

II.2.1. Caractérisation de la population

Les informations cliniques des patients ont pu être récupérées sur les dossiers cliniques contenus sur Orbis^R. Afin de classer facilement les patients, quatre catégories ont été créées pour décrire les symptômes justifiant la prescription de la coproculture :

- diarrhées simples
- diarrhées glairo-sanglantes
- suspicion de syndrome hémolytique et urémique
- absence de diarrhées, dans le cas où la justification de prescrire la coproculture est autre (bilan pré-greffe, vomissements, don de microbiote fécal)

La répartition des patients est la suivante : Parmi les 190 patients, 91 patients (47,9 %) souffrent de diarrhées simples, 24 (12,6 %) de diarrhées glairo-sanglantes, 20 (10,5 %) de syndrome hémolytique et urémique, tandis que 23 (12,1 %) des patients n'ont pas décrit de diarrhées, et il nous manque les données cliniques de 32 patients.

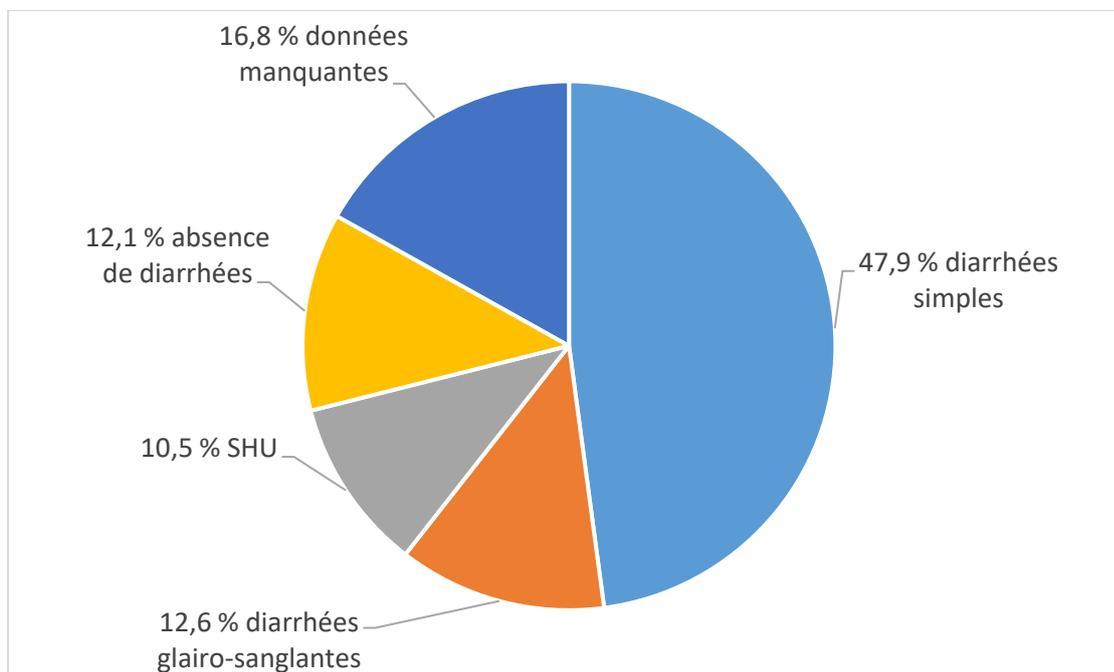


Figure 13 : Symptomatologie digestive des patients ayant une PCR positive pour *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

a- Caractérisation de l'ensemble de la population

En ce qui concerne l'âge des patients, la classe des enfants de moins de 10 ans est la plus représentée. Peu de prélèvements proviennent de jeunes adultes, puis on observe une augmentation des cas entre 50 et 70 ans. La répartition est plutôt bimodale.

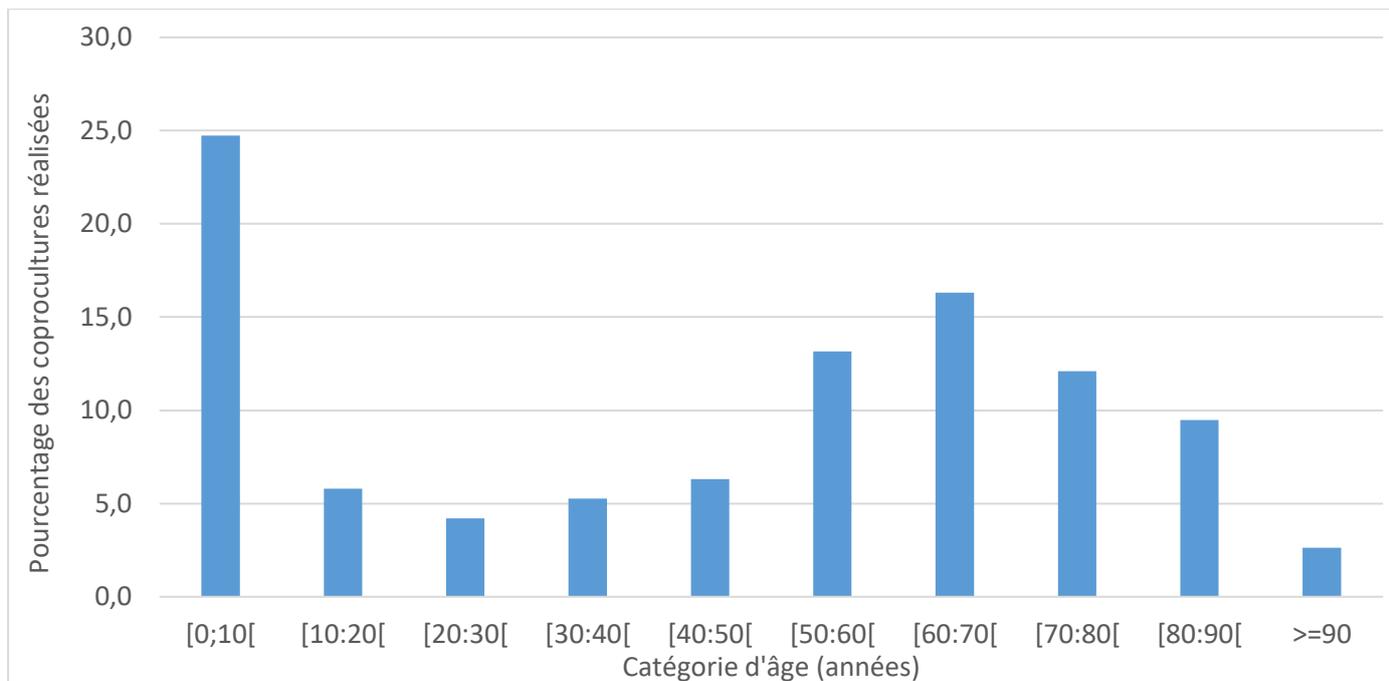


Figure 14 : Répartition de l'âge des patients ayant une PCR positive pour *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

Les services d'origine des patients sont variés, avec 34,2 % des patients tout âge confondu provenant des urgences, 12,1 % et 3,2 % des patients provenant respectivement d'hématologie et d'oncologie, 10 % des patients provenant de secteurs d'hépatogastroentérologie, 7,4 % des patients provenant de néphrologie et de l'unité de transplantation d'organes.

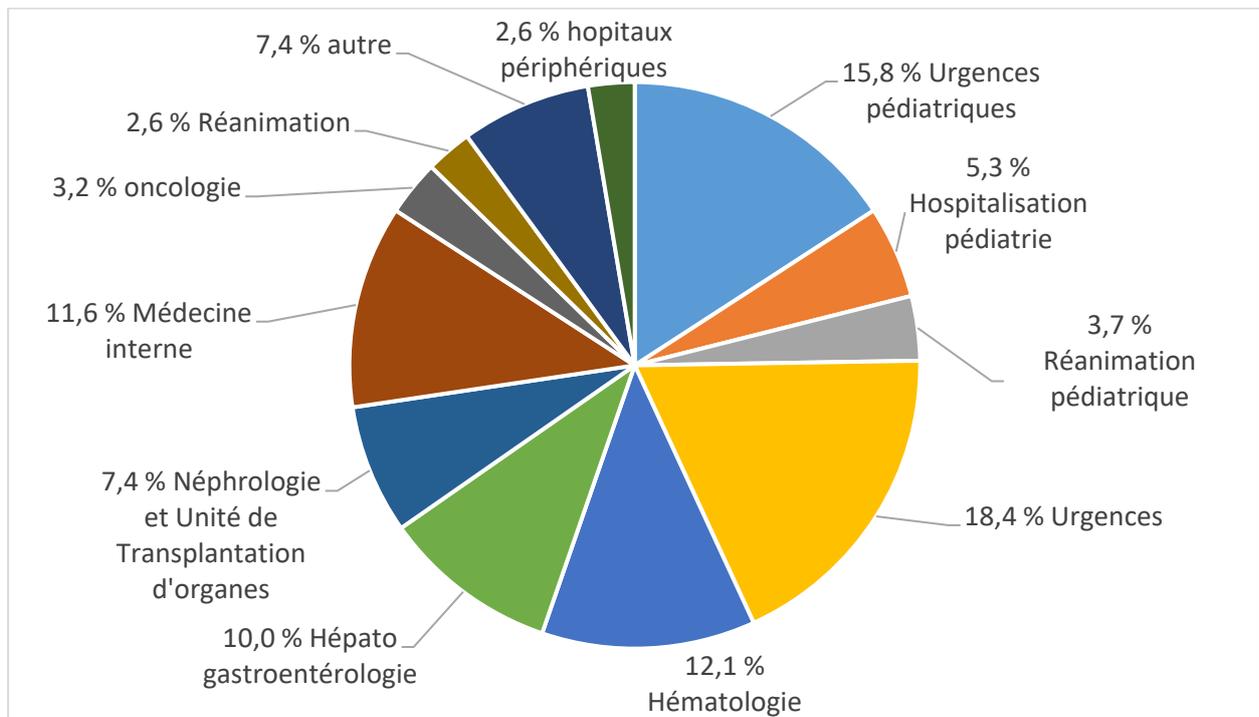


Figure 15 : Répartition des services des patients ayant une PCR positive pour *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

b- Caractérisation des patients atteints de SHU

Lorsque l'on regarde la population de patients atteints de SHU sur cette période, composée de 20 patients, on observe que 65 % des cas sont des enfants âgés de moins de 4 ans, ce qui est cohérent avec les données connues de la littérature.

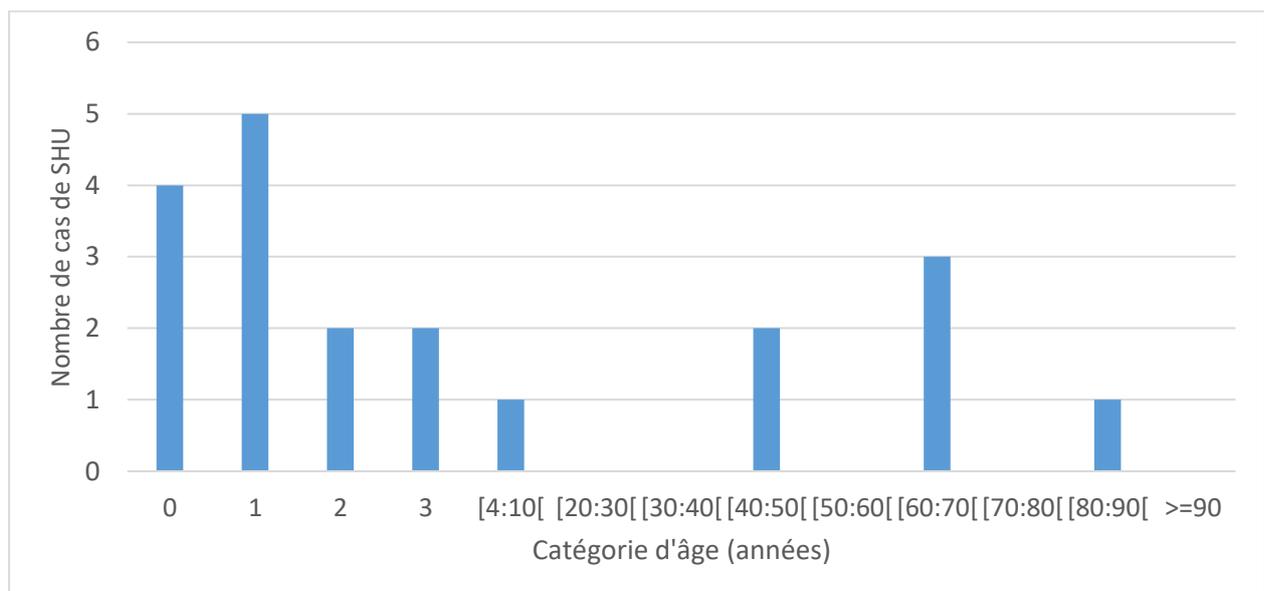


Figure 16 : Répartition de l'âge des patients atteints de SHU entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

En ce qui concerne les services des patients adultes souffrant de SHU, le service de néphrologie et d'unité de transplantation d'organes (UTO) reçoit la plupart des cas, avec 5 cas sur 6 au cours de cette période.

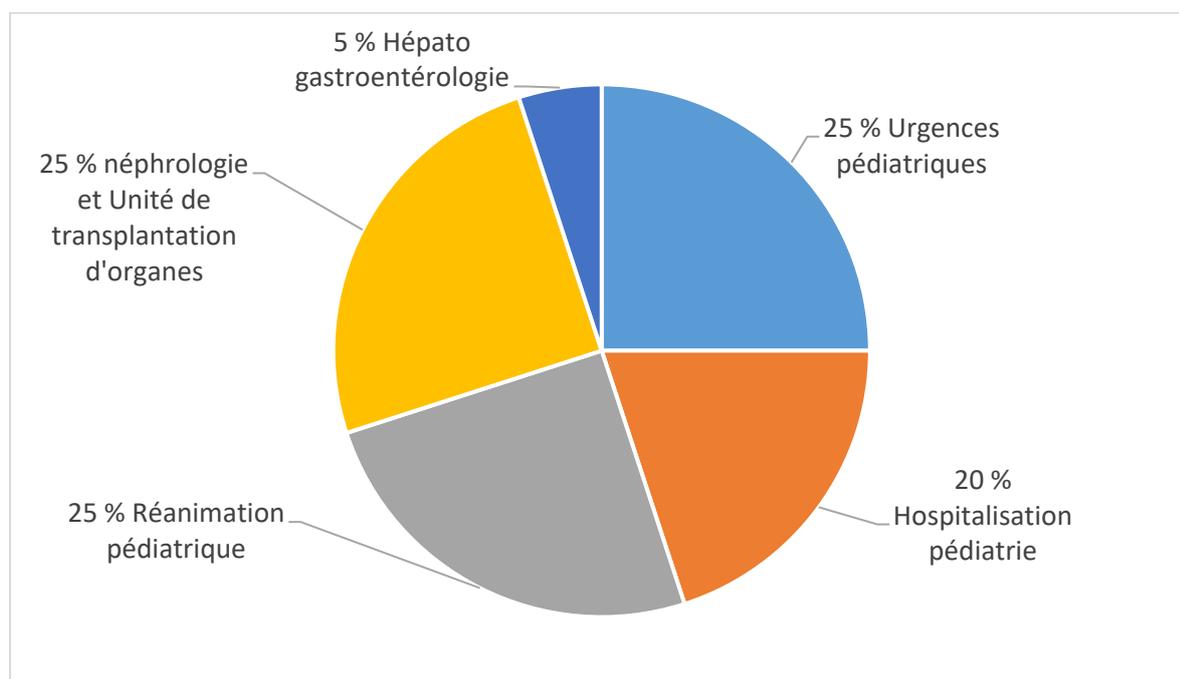


Figure 17 : Répartition des services recevant les patients atteints de SHU entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

c- Profil de virulence

Afin de caractériser la population, nous avons observé les profils de virulence des patients obtenus lors du passage des selles en Mobidiag^R. Toute symptomatologie confondue, l'association *stx2-eae* était observée pour 48 patients (25,1 %) et *stx2* est retrouvé seul pour 41 patients (21,5 %).

Tableau 6 : Profil de virulence des selles des 190 patients ayant une PCR positive pour *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse

	<i>stx 1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 eae</i>	<i>stx2 eae</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2 eae</i>
SHU	1 (5,0 %)	3 (15,0 %)	1 (5,0 %)	14 (70,0 %)	0	1 (5,0 %)
diarrhées glairo-sanglantes	3 (12,5 %)	3 (12,5 %)	7 (29,2 %)	4 (16,7 %)	4 (16,7 %)	3 (12,5 %)
diarrhées simples	10 (11,0 %)	21 (23,1 %)	14 (15,4 %)	18 (19,8 %)	15 (16,5 %)	13 (14,3 %)
absence de diarrhées	5 (21,7 %)	5 (21,7 %)	6 (26,1 %)	3 (13,0 %)	2 (8,7 %)	2 (8,7 %)
Données manquantes	3 (9,4 %)	9 (28,1 %)	6 (18,8 %)	9 (28,1 %)	2 (6,3 %)	3 (9,4 %)
Total	22 (11,5 %)	41 (21,5 %)	34 (17,8 %)	48 (25,1 %)	23 (12,0 %)	22 (11,5 %)

En tenant compte de la symptomatologie des patients, on observe que dans les selles des patients souffrant de SHU, *stx2* est détecté dans 85 % des cas, contre 10 % pour *stx1* et 5% pour *stx1* et *stx2* conjointement, tandis que toute symptomatologie confondue, cette différence est moins marquée, avec une détection de *stx2* dans 46,8 % contre 29,5 % pour *stx1* et 23,7 % pour *stx1* et *stx2*. De plus, le profil de virulence le plus observé pour les patients souffrant de SHU est l'association de *stx2* à *eae*, retrouvé pour 70 % des patients.

Parmi les selles positives pour *stx2* et *eae*, 29 % des patients souffrent de SHU, tandis que seuls 10,5 % des patients souffrent de SHU sur la population étudiée.

Toutefois, de la même manière que pour les sérogroupes, détecter deux facteurs de virulence dans un prélèvement de selle n'assure pas que ces deux facteurs de virulence sont portés par la même souche. Pour vérifier cela, il faudrait isoler les souches en culture, puis rechercher les facteurs de virulence sur la souche bactérienne. Cependant, des Ct proches pour les facteurs de virulence laissent présager qu'ils sont portés par la même souche.

De plus, nous recherchons les gènes codants pour les facteurs de virulence. L'expression de ces gènes étant réprimée lorsque le phage est en phage lysogénique, la détection de ces gènes n'assure pas que les shigatoxines sont excrétées par la souche bactérienne in vivo.

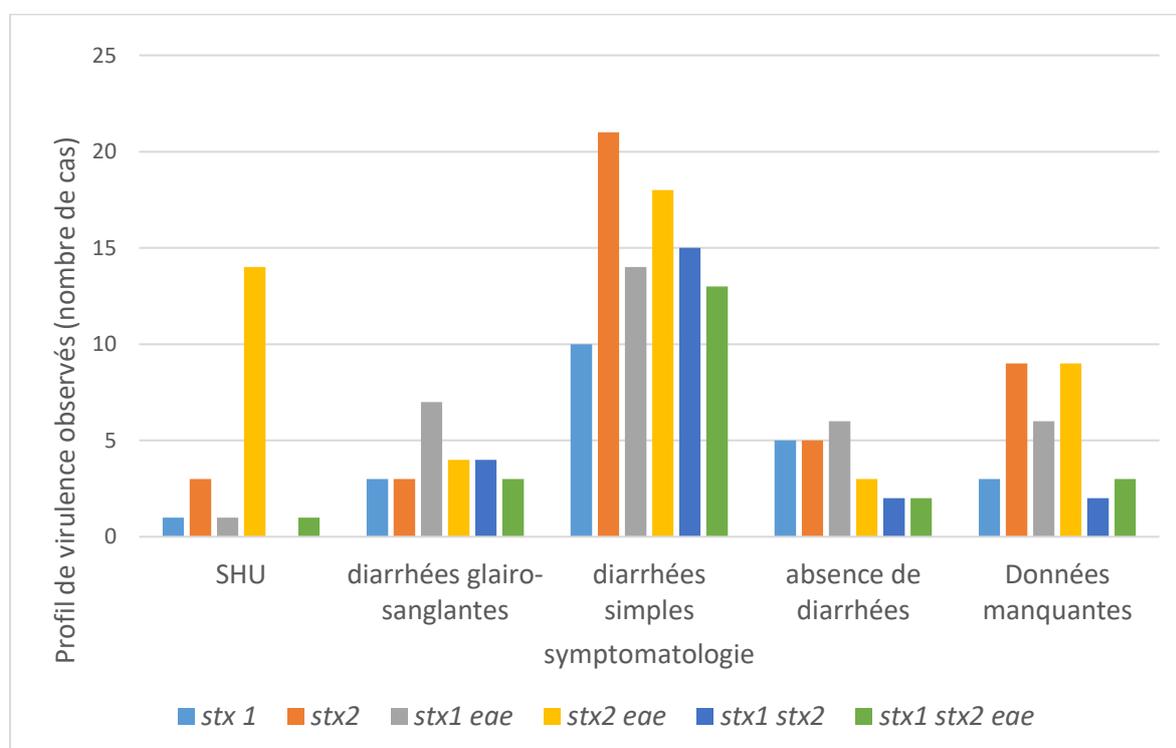


Figure 18 : Profils de virulence retrouvés dans les 190 échantillons de selles positifs pour *stx1* ou *stx2* en PCR entre juillet 2018 et juillet 2020 au CHU de Toulouse, en fonction de la symptomatologie

II.2.2. Contamination des selles par des souches

Les 8 souches de contrôle fournies par l'IRSD ainsi que 17 souches isolées de patients ont été ajoutées à des selles négatives en Mobidiag^R, tel que décrit précédemment.

En ce qui concerne les souches fournies par l'IRSD, elles ont été sérotypées et caractérisées : les facteurs de virulence sont portés par la souche du sérotype détecté. On peut ainsi étudier le lien entre le nombre de cycles de PCR des facteurs de virulence et le nombre de cycles de PCR du sérotype détecté. Les résultats sont donnés dans le tableau 5 et sont exprimés en nombres de cycle de PCR (Ct).

Tableau 7 : Résultats de la PCR Mobidiag^R et de la PCR visant les sérogroupes dans les selles contaminées par des souches de STEC

souches ajoutées à selles puis extraites	stx1	stx2	eae	O157	O26	O111	O145	O103	O45	O121	O80
Souche INRA O157	19,88	19,77	20,27	21,11	-	-	-	-	-	-	-
Souche INRA O26	21,68	35,03	22,01	-	23,29	-	-	-	-	-	-
Souche INRA O145	-	20,53	20,82	-	-	-	21,83	-	-	-	-
Souche INRA O80	-	20,7	19,96	-	-	-	-	-	-	-	21,45
Souche INRA O111	20,18	-	20,52	-	-	22,19	-	-	-	-	-
Souche INRA O45	19,48	-	20,25	-	-	-	-	-	21,17	-	-
Souche INRA O121	-	18,53	19,19	-	-	-	-	-	-	19,93	-
Souche INRA O103	19,85	-	20,5	-	-	-	-	22,27	-	-	-
Patient 83	19,54	38,18	20,16	-	21,74	-	-	-	-	-	-
Patient 14	-	22,24	21,77	-	23,43	-	-	-	-	-	-
Patient 124	-	19,64	19,8	-	-	-	-	-	20,88	-	-
Patient 164	20	19,89	36,39	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 156	-	19,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 93	-	19,26	18,83	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 77	-	18,2	18,12	-	-	-	-	-	-	-	18,59
Patient 152	18,69	18,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 49	-	19,35	19,19	20,61	-	-	-	-	-	-	-
Patient 3	-	16,91	18,09	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 4	-	16,93	17,43	-	-	-	-	-	-	18,69	-
Patient 17	19,18	-	19,58	-	20,82	-	-	-	-	-	-
Patient 55	-	17,13	18,22	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 12	-	18,43	19,3	-	-	-	20,64	-	-	-	-
Patient 20	-	18,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 349 705	-	18,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9310-1858	-	19,55	19,41	-	-	-	-	-	20,1	-	-

Pour chacune des souches fournies par l'INRA, la PCR ciblant *stx1* et/ou *stx2* s'est positivée avant celle ciblant les sérogroupes, avec une différence entre les Ct allant de 0,75 à 2,45, et située pour la plupart des sérogroupes entre 1,3 et 2. Pour les souches isolées de selles des patients, 9 souches ont pu être sérogroupées, les autres appartenant probablement à des sérogroupes non ciblés par notre PCR. La PCR ciblant les shigatoxines s'est positivée 0,39 à 2,21 cycles avant la PCR du séro groupe détecté.

Cette concordance entre les Ct des facteurs de virulence et les Ct des sérogroupes au cours de cette manipulation sur souches sérotypées valide la méthode, et permet de faire une extrapolation de ces résultats sur selles de patients : Si on détecte une shigatoxine et un séro groupe sur selles, avec la PCR *stx1* et/ou *stx2* qui se positive entre 0,75 et 2,45 cycles avant le séro groupe détecté, on peut alors faire l'hypothèse que la souche du séro groupe détecté est probablement la souche toxigène. Lorsque la différence entre les nombres de cycles est plus élevée, le lien est plus incertain et doit dans certains cas être discuté.

II.2.3. Analyse rétrospective sur selles de patients par extrapolation

Après cette première étape de contamination de selles négatives par des souches sérotypées, les selles de patients ayant une PCR positive pour *stx1* ou *stx2* entre juillet 2018 et juillet 2020 ont été passées sur la technique de PCR multiplex visant les sérogroupes. Les résultats sont fournis sous formes de nombre de cycles de PCR (Ct) dans l'Annexe 2.

Nous avons extrapolé les résultats obtenus lors des premières manipulations à nos résultats obtenus sur selles de patients, afin de déterminer si l'association d'un facteur de virulence et d'un séro groupe était probable ou peu probable. Nous avons fait l'hypothèse qu'une association entre les facteurs de virulence et le séro groupe détecté était probable si la PCR visant les sérogroupes se positive 0,8 à 2,5 cycles après la PCR Mobidiag^R.

On peut supposer une association pour 34 patients sur 190, ou en fonction de la symptomatologie, chez :

- 9 sur les 20 patients souffrant de SHU (45 %)
- 4 sur les 24 patients souffrant de diarrhées glairo-sanglantes (16,7 %)
- 14 sur les 91 patients souffrant de diarrhées simples (15,4 %)

- 3 sur les 23 patients n'ayant pas de diarrhées (13 %)
- 4 sur les 32 patients dont nous n'avons pas d'informations cliniques pertinentes (12,5 %)

De même, 30 selles de patients de plus de 16 ans ayant une PCR Mobidiag^R négative et 30 selles de patients de moins de 16 ans ayant une PCR Mobidiag^R négative ont été passées sur la PCR multiplex visant les sérogroupes. Les résultats des témoins sont disponibles dans l'Annexe 3. Seul le sérotype O45 a été détecté chez 2 patients, avec des Ct de 36,40 et 39,33. Au vu du Ct élevé, on peut penser à une contamination ou à la présence dans la selle une souche non toxigène de sérotype O45 en quantité assez faible. Ainsi, les principaux sérogroupes ne sont pas retrouvés chez les patients n'ayant pas de pathovars, mais sont retrouvés chez les patients dont les selles contiennent des toxines. Statistiquement, la présence de ces sérogroupes paraît donc reliée à la présence de *stx1* ou *stx2*.

II.2.4. Prévalence des sérogroupes

a- Sur l'ensemble des échantillons

Sur les 190 selles étudiées, 84 ont une PCR positive pour au moins un sérotype :

- 60 selles sont positives pour 1 sérotype
- 15 selles sont positives pour 2 sérotypes
- 8 selles sont positives pour 3 sérotypes
- 1 selle est positive pour 5 sérotypes

soit 118 sérotypes détectés pour ces 190 selles.

Tableau 8: Fréquence des sérogroupes retrouvés par la PCR multiplex sur selles

Sérogroupe	Nombre de PCR positives sur selles
O45	23 (19,5 %)
O80	21 (17,8 %)
O26	19 (16,1 %)
O145	17 (14,4 %)
O103	16 (13,6 %)
O121	10 (8,5 %)
O157	9 (7,6 %)
O111	3(2,5 %)

En ce qui concerne les sérogroupes retrouvés, le plus fréquent est O45 (19,5 % des sérogroupes détectés), suivi par O80 (17,8 %) et O26 (16,1 %).

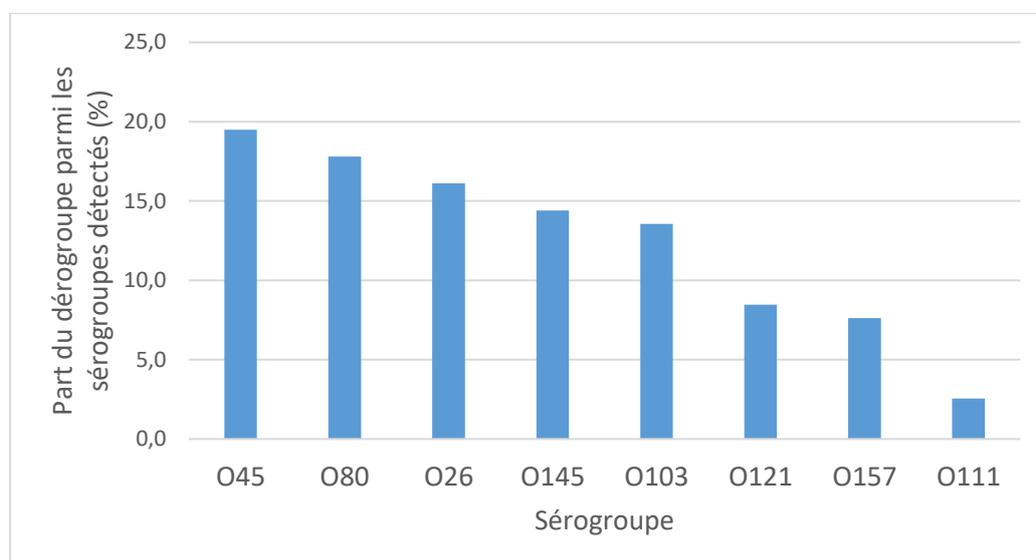


Figure 19 : Répartition des sérogroupes détectés sur les 190 selles stx+ sur la période juillet 2018 – juillet 2020 au CHU de Toulouse

b- Chez les patients atteints de SHU

Si on s'intéresse à la population de patients souffrant de SHU, 11 selles sur les 20 étudiées sont positives pour au moins un sérogroupe:

- 9 selles sont positives pour un seul sérogroupe
- 2 selles sont positives pour 2 sérogroupes
- 1 selle est positive pour 3 sérogroupes

soit 16 sérogroupes détectés.

Leur répartition diffère de celle de l'ensemble des selles, avec une prédominance des sérogroupes O26 (9 selles détectées positives) et O80 (4 selles détectées positives), qui représentent ainsi respectivement 56,3 et 25 % des sérogroupes détectés dans les selles de patients souffrant de SHU sur cette période.

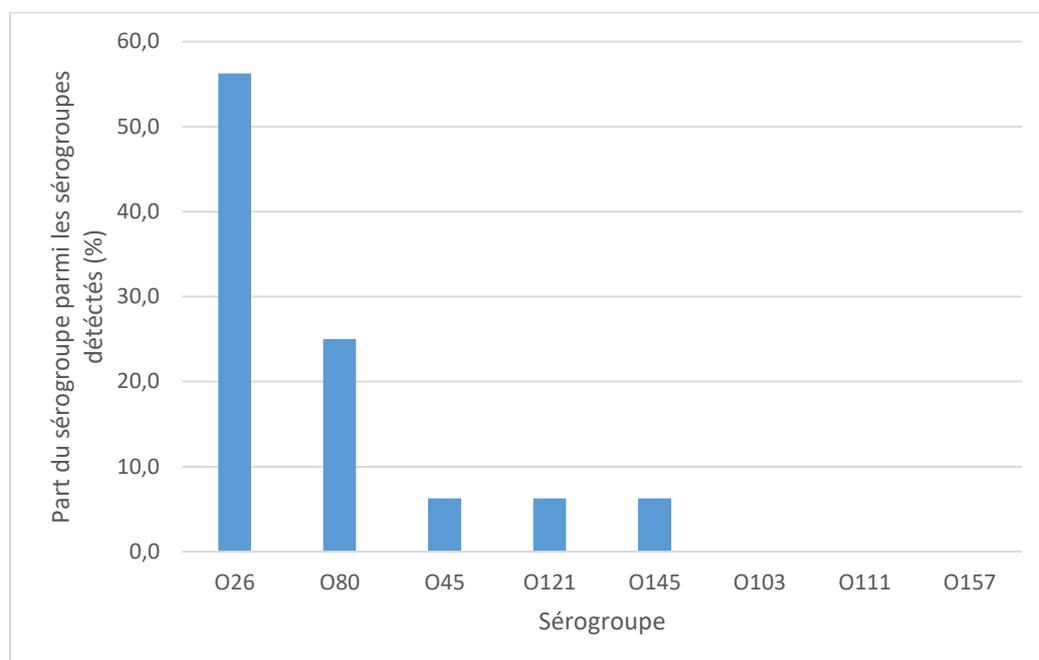


Figure 20 : Répartition des sérogroupes détectés sur les 20 selles de patients souffrant de SHU sur la période juillet 2018 – juillet 2020 au CHU de Toulouse

En ce qui concerne les selles où l'association entre un séroroupe et une shigatoxine est probable, le séroroupe O26 est impliqué 7 fois, O80 une fois et O145 une fois.

Si on compare cette répartition avec les sérogroupes observés par le CNR des *E.coli*, les sérogroupes O26 (37,3 %) et O80 (23,8 %) étaient les plus représentés sur l'activité d'exercice 2018, suivi de O157 (11,1 %), O145 (7,9 %), O121 (4 %), O103 (3,2 %) et O111 (2,4 %) en ce qui concerne des sérogroupes que nous avons recherché. Nos résultats sont ainsi cohérents par rapport à ceux observés au niveau du CNR, avec cependant l'absence de SHU lié au séroroupe O157 sur la période étudiée.

II.3- Discussion

Les résultats obtenus lors de la contamination de selles négatives en Mobidiag^R par des souches sérotypées référencées fournies par l'INRA sont satisfaisants. Lorsque cette manipulation était réalisée sur des souches isolées de patients, les résultats étaient comparables. Nous avons extrapolé ces résultats aux PCR effectuées sur selles de patients, en admettant une association probable lorsque la PCR du sérotype détecté se positive 0,75 à 2,45 Ct après la PCR Mobidiag^R.

En revanche, peu de souches de patients ont été étudiées (17 souches) et il serait intéressant de passer davantage de souches.

Pour confirmer qu'une souche d'un sérotype ciblé est toxigène, la toxine doit être détectée par des techniques réalisées sur la souche bactérienne après s'être assuré que celle-ci est vraiment pure. En réalisant cette manipulation de contamination de selles négatives avec davantage de selles sérotypées, l'association entre le Ct de la PCR multiplex visant les sérotypes et le Ct de la PCR Mobidiag^R pour *stx1/stx2/eae* pourra être renforcée et pourra être une alternative à l'isolement des souches au laboratoire. En revanche, l'isolement des souches reste intéressant pour les envoyer au CNR pour une caractérisation plus approfondie.

- Pour 34 patients, une association était probable entre le sérotype détecté et les facteurs de virulence observés.

Il est intéressant de voir que ces associations sont davantage retrouvées chez les patients souffrant de SHU (45 %) que chez les autres patients (14,7 %). La présence d'une clinique bruyante paraît associée à davantage de corrélation entre les deux PCR utilisées. Pour les patients ayant une clinique plus discrète, il est probable que les souches des sérotypes détectés apparaissent comme étant du portage.

- Pour 15 patients, une association douteuse était suspectée.

La raison pouvait être variée. Pour certains patients, la différence de Ct entre les deux PCR était en dehors de l'intervalle fixé. Pour ces patients, lorsqu'aucun autre sérotype n'est détecté et que les Ct sont peu éloignés de l'intervalle fixé, l'association reste possible. Une

étude sur davantage de souches serait alors intéressante pour affiner l'association dans ces cas-là.

Pour d'autres patients, deux sérogroupes étaient détectés en PCR avec un Ct compatible, il est donc difficile d'affirmer quelle est la souche en cause.

Enfin, pour certains patients, une association entre le séro groupe et *eae* était pertinente. La souche ne peut alors pas être définie comme un STEC mais il est possible que la souche ait perdue le gène de la toxine au cours des divisions.

En ce qui concerne la corrélation de ces résultats avec la clinique du patient, on aurait pu penser que les Ct les plus précoces soient observés lors de la présence d'un SHU par rapport à une symptomatologie plus fruste. Cela ne se vérifie pas dans nos résultats, avec des Ct parfois assez élevés lors de SHU, le patient 5 ayant un Ct de 32,91 pour *stx2*, tandis que le patient 77 ayant des diarrhées simple, a un Ct de 15,35 pour *stx2*.

En revanche, aucun Ct supérieur à 35 avec une association probable n'est retrouvé en cas de SHU ou de diarrhées glairo-sanglantes. Ainsi, au-delà de 35 cycle, le STEC détecté semble être associé à du portage.

Un ou plusieurs sérogroupes ont pu être isolés dans 84 selles sur les 190 étudiées, soit 44,2 % des selles, et dans 12 selles des 20 patients atteints de SHU, soit 60 %. Ce résultat est concordant avec celui de l'état des lieux des souches responsables de SHU en France a été réalisé entre 2007 et 2016, où 496 sérogroupes avaient été détectés par PCR sur 942 selles, soit 52,7 %. (Bruyand, 2019).

Pour les 8 patients (40 %) souffrant de SHU dont aucun séro groupe n'a été détecté, les souches responsables de l'infection appartiennent à d'autres sérogroupes moins fréquents, non ciblés par la PCR multiplex mise en place. Il s'agit de la limite de cette technique, qui n'est pas exhaustive. Il serait possible de cibler davantage de sérogroupes, mais cela représente un coût et un temps de manipulation plus important.

En ce qui concerne la méthodologie, peu de souches ont pu être isolées : 17 souches pour 190 selles soit 8,9 %, dont 6 souches pour les 20 cas de SHU, soit 30 %.

En comparaison, sur l'année 2018, le CNR a reçu 1041 selles, dont 559 avaient une PCR positive pour les shigatoxines. Sur ces 559 selles, 309 souches ont pu être isolées, soit 55,3 %. Sur les 135 cas de SHU pédiatriques déclarés en 2018, 104 souches ont pu être

isolées (77,0 %) (Rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, Shigella et Salmonella, Institut Pasteur, 2019).

Afin d'améliorer ce taux d'isolement, il serait envisageable d'utiliser des milieux chromogènes, de meilleure sensibilité pour détecter les souches de STEC.

Concernant la technique, lors de la mise en place au laboratoire en routine, des améliorations seront à mettre en place pour simplifier la méthodologie :

- D'autres programmes seront testés pour trouver un programme compatible avec tous les sérogroupes, pour pouvoir lancer la manipulation sur une seule plaque.
- Des sondes seront commandées avec d'autres fluorochromes, afin de diminuer le nombre de milieux réactionnels. Par exemple, commander une sonde visant O111 en HEX et O103 en HEX permettraient de faire deux PCR Triplex (O157 O26 et O111 et O80 O145 O103) et un PCR duplex (O121 O45).
- la technique utilisée fonctionne en système ouvert, il existe donc un risque de contamination des échantillons par d'autres échantillons.

L'utilisation de cette technique nous a permis d'avoir un aperçu des souches circulantes, ainsi que des souches responsables de SHU au sein du CHU de Toulouse.

Il est intéressant, au point de vue épidémiologique, de connaître les souches retrouvées chez l'homme et potentiellement responsables de SHU : en effet, les contrôles agroalimentaires et vétérinaires pourraient être adaptés aux sérogroupes retrouvés chez l'homme et responsables d'infection.

Le second intérêt est de permettre la réalisation d'une enquête épidémiologique lors de cas groupés. En effet, retrouver le même sérotype chez plusieurs patients au cours d'une certaine période peut suggérer une source de contamination commune. Lors de l'épidémie liée à O104 :H4 en 2011, le sérotypage dans des aliments suspects a permis de remonter à la source de la contamination.

En revanche, d'un point de vue clinique, connaître le sérotype de STEC responsable de la pathogénicité ne modifie pas la prise en charge. Historiquement, il était décrit une pathogénicité plus sévère du sérotype O157. Or, les données épidémiologiques récentes montrent un recul du sérotype O157 face à l'émergence d'autres sérotypes, comme O26 et O80 (Bruyand, 2019).

Il est également décrit dans la littérature que d'un point de vue clinique, le profil de virulence des souches est plus parlant que le sérotype, avec une symptomatologie plus sévère de *stx2* par rapport à *stx1* (Scheutz, 2014), et de l'association de *stx2* à *eae* (Gyles, 2007).

On peut en effet observer dans notre travail que 85 % des selles de patients atteints de SHU ont une PCR *stx2* positive, et 70 % sont positives pour *stx2* et *eae*. En 2018, sur les 126 cas de SHU dont les profils de virulence ont été étudiés au CNR, 108 souches avaient une PCR positive pour *stx2*, soit 85,7 %, et 102 souches avaient un profil *stx2+ eae+*, soit 81,0 % des cas de SHU (Rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, Shigella et Salmonella, Institut Pasteur, 2019). Il paraît, d'un point de vue clinique, plus pertinent de regarder le profil de virulence que le sérotype des souches pour prédire le pouvoir pathogène de la souche. Cependant, le diagnostic de SHU est parlant cliniquement et biologiquement, et la recherche bactériologique permet seulement une confirmation de l'étiologie.

Conclusion

Le syndrome hémolytique et urémique est une pathologie aux complications graves. Malgré son incidence faible, il représente la première cause d'insuffisance rénale chez l'enfant de moins de 5ans. La majorité de SHU sont liés aux STEC et sont ainsi évitables par la mise en place de mesures de prévention individuelles (modification des habitudes alimentaires et de vie), mais également collectives, par des contrôles agroalimentaires et vétérinaires. Une connaissance des STEC responsables de SHU est alors intéressante pour adapter au mieux ces contrôles. De même, lors de cas groupés, une connaissance de la souche en cause permet de remonter à la source commune de contamination, afin de mettre en place des mesures de retrait de lots pour éviter de nouvelles contaminations.

Cette étude nous a permis de faire un état des lieux des sérogroupes de STEC circulants au CHU de Toulouse. Les résultats sont satisfaisants et cohérents avec les données nationales.

On observe une diminution du séro groupe O157 décrit historiquement, au profit de sérogroupes émergents tels que O26 et O80.

La validation de la méthode à l'aide de souches sérotypées a permis d'évoquer un lien entre les Ct des shigatoxines et des sérogroupes. Un travail sur davantage de souches sera intéressant pour confirmer ce travail.

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 1 / 8
------------------------------------	--	--------------

1 OBJET / PRINCIPE

Cette procédure décrit le mode opératoire pour l'amplification de gènes ciblés pour détecter différents sérogroupes de STEC (*E.coli* producteurs de shigatoxines) à partir d'échantillons de selles par PCR en temps réel sur le LC480 (Roche Diagnostics).

Cette recherche est intéressante lorsque les gènes *stx1* et/ou *stx2* codant pour les shigatoxines sont détectés par PCR temps réel à l'aide du test Amplidiag Bacterial GE lors d'une demande de coproculture par le service.

Les STEC causent des diarrhées allant de la diarrhée simple à la colite hémorragique, et peuvent induire des syndromes hémolytiques et urémiques chez le jeune enfant dont les séquelles rénales en font la gravité.

Réaction de PCR en temps réel multiplex utilisant huit sondes fluorescentes :

- FAM (émission à 520 nm) pour la détection de *rfbE* (O157)
- FAM (émission à 520 nm) pour la détection de *wbdl* (O111)
- FAM (émission à 520 nm) pour la détection de *ihp1* (O145)
- FAM (émission à 520 nm) pour la détection de *wzx* (O103)
- FAM (émission à 520 nm) pour la détection de *wzx* (O45)
- HEX (émission à 560 nm) pour la détection de *wzx* (O121)
- Cy5 (émission à 662 nm) pour la détection de *wzx* (O26)
- Cy5 (émission à 662 nm) pour la détection de O80

2 DOMAINE D'APPLICATION

Ce domaine s'applique aux techniciens du secteur biologie moléculaire de bactériologie.

3 DOCUMENTS ASSOCIES

- 📄 <http://srv-kalilab/DX-PTI-BIOM-007> Fiches techniques fournisseurs réactifs
- 📄 <http://srv-kalilab/PT-PTI-BIOM-002> Organisation générale du secteur de biologie moléculaire
- 📄 <http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-QUAL-006> Guide KaliLab : Utilisation pratique
- 📄 <http://srv-kalilab/DE-PTI-BIOM-001> Feuille de bord : préparation réactifs et contrôles
- 📄 <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-016> Utilisation et maintenance de l'extracteur d'acides nucléiques MagNa Pure 96
- 📄 <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-126> Reconstitution des amorces et des sondes
- 📄 <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-023> Utilisation du Light Cycler 480.

4 DEFINITIONS / ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
PCR : polymérase chain réaction
TBE : tris-borate-EDTA
BM : Biologie moléculaire

5 EQUIPEMENTS / FOURNITURES

5.1 CONSOMMABLES /MATERIEL

Micropipettes ; P200 ; P100 ; P40 ; P20 ; P10 et cônes à filtres stériles

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 2 / 8
------------------------------------	--	--------------

Safe-Lock Tubes Eppendorf 1,5mL
 Tubes pour PCR classique / Bouchons tubes PCR
 Plaque Amplification/Detection 0,3mL 96 puits + Film (Réf. 05232724-24, Roche)
 Light Cycler LC 480 (Roche Diagnostics) (pièce PII-332)
 MagNA Pure 96 : ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS

5.2 REACTIFS

Amorces

rfbE (O157)-F: 5'-TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA-3'
 rfbE (O157)-R: 5'-CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT-3'
 wbdI (O111)-F: 5'-CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT-3'
 wbdI (O111)-R: 5'-TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC-3'
 ihp1(O145)-F: 5'-CGATAATATTTACCCACCCAGTACAG-3'
 ihp1(O145)-R: 5'-GCCGCCGCAATGCTT-3'
 wzx (O103)-F: 5'-CAAGGTGATTACGAAAATGCA TGT-3'
 wzx (O103)-R: 5'-GAAAAAAGCACCCCCGTACTTAT-3'
 wzx (O45)-F: 5'-CGTTGTGCATGGTGGCAT-3'
 wzx (O45)-R: 5'-TGGCCAAACCAACTATGAACTG-3'
 wzx (121)-F: 5'-AGGCGCTGTTTGGTCTCTTAGA-3'
 wzx (O121)-R: 5'-GAACCGAAATGATGGGTGCT-3'
 wzx (O26)-F: 5'-CGCGACGGCAGAGAAAATT-3'
 wzx (O26)-R: 5'-AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTTT-3'
 O80-F: 5'-ATCATCCTTGGTTGCTGCTG-3'
 O80-R: 5'-CGAGAGTACCTGGTTCCCAA-3'

Sondes

rfbE(O157): 5'-AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG-3'
 wbdI (O111): 5'-TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA-3'
 ihp1(O145): 5'-CCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG-3'
 wzx (O103): 5'-CATAGCCTGTTGTTTTAT-3'
 wzx (O45): 5'-ATTTTTTGGCTGCAAGTGGGCTGTCCA-3'
 wzx (O121): 5'-CGCTATCATGGCGGGACAATGACAGTGC-3'
 wzx (O26): 5'-CCCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA-3'
 O80: 5'-CCGATCACGCCAATCAGGATGGC-3'

LightCycler 480 Probes Master (Réf. 812573, Roche)

Eau qualité BM

Réactifs pour extraction au Magna 96

- MP 96 - DNA AND VIRAL NA SMALL VOLUME KIT (576 extract) REF 06543588001
Réf : 808302 (routine)
- MP 96 - DNA AND VIRAL NA LARGE VOLUME KIT (288 extract) REF 06374891001
Réf : 815125 (dérogatoire)
- BM-HIGH PURE PCR TEMPLATE PREP KIT (100TESTS) REF 11796828001
(dérogatoire)

6 CONTENU

6.1 PROCESSUS PRE-ANALYTIQUE

6.1.1 Réception et stockage des échantillons avant analyse

Après enregistrement par le pré-analytique, les prélèvements sont acheminés au 3^{ème} étage de l'IFB.

Ils sont ensuite stockés à +4°C en pièce Extraction PII 303 en attendant d'être traités.

6.1.2 Contrôle des échantillons à réception

Chaque prélèvement associé à un sérogroupage des STEC par PCR est contrôlé à réception par les techniciens de Bactériologie moléculaire.

Le **contrôle à réception** comprend les points suivants :

- identité (concordance étiquette service / étiquette MOLIS) ;
- nature de l'échantillon ;
- conformité du contenant ;

Vérifier que tous les prélèvements de la liste de travail sont présents.

Pour toute anomalie détectée lors de ce contrôle, tracer une non-conformité sur le SIL MOLIS dans le dossier correspondant (cf. <http://srv-kalilab/IT-PTI-PREA-011>), et prévenir un biologiste du secteur pour connaître la conduite à tenir (refus du prélèvement, dérogation, appel prescripteur...).

6.2 PROCESSUS ANALYTIQUE

6.2.1 EXTRACTION (PIECE PII 303)

L'ADN des échantillons biologiques est extrait automatiquement par le Magna 96 (Roche) selon la procédure <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-016>.

6.1.2 RECONSTITUTION DES AMORCES et des SONDES (PIECE PII-301).

Voir procédure spécifique <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-126>.

6.1.3 PCR EN TEMPS REEL

- Préparation des mix (pièce PII-301)

La manipulation comprend 5mix :

- Mix 1 : O157 + 026
- Mix 2 : O145 + 080
- Mix 3 : O111
- Mix 4 : O45+ O121
- Mix 5 : O103

Prévoir dans le calcul des quantités pour le mix : $n + 3$ échantillons, n étant le nombre de d'échantillons à tester + 3 tubes pour les témoins négatif et positif et les erreurs de pipetage. Dans un tube Eppendorf préalablement identifié, préparer le mix comme suit :

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 4 / 8
------------------------------------	--	--------------

Mix 1

Réactifs	Quantité par tube (µL) pour 20 µL final
Taq LC480 Roche	12,5
Amorce O157-F (20 µM)	0,25
Amorce O157-R (20 µM)	0,25
Sonde O157 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2,0
Amorce O26-F (20µM)	0,25
Amorce O26-R (20µM)	0,25
Sonde O26 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2
H ₂ O	2,5

Mix 2

Réactifs	Quantité par tube (µL) pour 20 µL final
Taq LC480 Roche	12,5
Amorce O145-F (20 µM)	0,25
Amorce O145-R (20 µM)	0,25
Sonde O145 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2,0
Amorce O80-F (20µM)	0,25
Amorce O80-R (20µM)	0,25
Sonde O80 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2
H ₂ O	2,5

Mix 3

Réactifs	Quantité par tube (µL) pour 20 µL final
Taq LC480 Roche	12,5
Amorce O111-F (20 µM)	0,25
Amorce O111-R (20 µM)	0,25
Sonde O111 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2
H ₂ O	5

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 5 / 8
------------------------------------	--	--------------

Mix 4

Réactifs	Quantité par tube (µL) pour 20 µL final
Taq LC480 Roche	12,5
Amorce O45-F (20 µM)	0,25
Amorce O45-R (20 µM)	0,25
Sonde O45 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2,0
Amorce O121-F (20µM)	0,25
Amorce O121-R (20µM)	0,25
Sonde O121 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2
H ₂ O	2,5

Mix 5

Réactifs	Quantité par tube (µL) pour 20 µL final
Taq LC480 Roche	12,5
Amorce O103-F (20 µM)	0,25
Amorce O103-R (20 µM)	0,25
Sonde O103 (2 µM) (concentration finale 0,2 µM)	2
H ₂ O	5

- Distribution des échantillons dans la plaque d'amplification (pièce PII-303)

La manipulation doit se faire sur deux plaques de PCR distinctes, en raison de 2 programmes de PCR différents. Les mix 1,2,3,4 sont distribués sur la plaque 1. Le mix 5 est distribué sur la plaque 2.

La distribution du mix et des échantillons doit se faire sous la PSM de type 2.

Distribuer 20 µL de Mix dans chaque puits de la plaque.

Distribuer 5 µL d'eau BM dans le puit du témoin négatif.

Distribuer 5 µL d'extrait d'ADN de la souche contrôle pour le CIQI.

Ajouter 5 µL d'extrait d'ADN pour chaque échantillon testé.

Remarque : Afin d'éviter les erreurs lors de la distribution sur les puits de plaque, noter au marqueur les emplacements sur la plaque.

- Amplification (pièce PII-332)

L'amplification est réalisée sur un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics).

La lecture se fait en FAM à 510 nm, en HEX à 580 nm et en Cy5 à 660 nm pour la détection des différents sérogroupes ciblés.

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 6 / 8
------------------------------------	--	--------------

Pour la plaque 1 contenant les mix 1,2,3 et 4 (sérogroupes O157, O26, O145, O80, O111, O45, O121), le programme du Light Cycler correspond au programme suivant :

Mise en température	Dénaturation initiale	45 cycles	Refroidissement
50°C / 2 min	95°C / 10 min	95°C / 10 s	40°C / 30 s
		60°C / 30 s	

Pour la plaque 2 contenant le mix 5 (séro groupe O103), le programme du Light Cycler correspond au programme suivant :

Mise en température	Dénaturation initiale	45 cycles	Refroidissement
50°C / 2 min	95°C / 10 min	95°C / 10 s	40°C / 30 s
		55°C / 30 s	

6.2 CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Les extraits d'ADN sont conservés dans les tubes Eppendorf (recueil de l'éluât en fin d'extraction) pendant 1 an minimum à -20°C (pièce Sous-Sol) dans la boîte prévue à cet effet.

Les prélèvements sont conservés dans les tubes primaires dans le réfrigérateur à +4°C jusqu'à obtention du résultat de la PCR.

6.3 GARANTIE DE QUALITE DES RESULTATS : CIQ

Afin de démontrer la reproductibilité de la méthode et garantir la qualité des résultats, un contrôle interne de qualité (CIQ) est testé lors de chaque série.

Ce CIQI est préparé à partir d'une souche bactérienne de référence. Un témoin négatif est également testé à chaque série, ceci afin de garantir l'absence de contamination du mix PCR.

Le suivi du CIQI est effectué sur le module MOLIS QC (<http://srv-kalilab/IT-PTI-INFO-009>). La gestion des résultats des CIQ est décrite dans la procédure <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-122>.

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 6 / 8
------------------------------------	--	--------------

Pour la plaque 1 contenant les mix 1,2,3 et 4 (sérogroupes O157, O26, O145, O80, O111, O45, O121), le programme du Light Cycler correspond au programme suivant :

Mise en température	Dénaturation initiale	45 cycles	Refroidissement
50°C / 2 min	95°C / 10 min	95°C / 10 s	40°C / 30 s
		60°C / 30 s	

Pour la plaque 2 contenant le mix 5 (sérogroupe O103), le programme du Light Cycler correspond au programme suivant :

Mise en température	Dénaturation initiale	45 cycles	Refroidissement
50°C / 2 min	95°C / 10 min	95°C / 10 s	40°C / 30 s
		55°C / 30 s	

6.2 CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Les extraits d'ADN sont conservés dans les tubes Eppendorf (recueil de l'éluât en fin d'extraction) pendant 1 an minimum à -20°C (pièce Sous-Sol) dans la boîte prévue à cet effet.

Les prélèvements sont conservés dans les tubes primaires dans le réfrigérateur à +4°C jusqu'à obtention du résultat de la PCR.

6.3 GARANTIE DE QUALITE DES RESULTATS : CIQ

Afin de démontrer la reproductibilité de la méthode et garantir la qualité des résultats, un contrôle interne de qualité (CIQ) est testé lors de chaque série.

Ce CIQI est préparé à partir d'une souche bactérienne de référence. Un témoin négatif est également testé à chaque série, ceci afin de garantir l'absence de contamination du mix PCR.

Le suivi du CIQI est effectué sur le module MOLIS QC (<http://srv-kalilab/IT-PTI-INFO-009>). La gestion des résultats des CIQ est décrite dans la procédure <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-122> .

Mode opératoire Technique MT	Détection des sérogroupes de STEC par PCR en temps-réel	Page : 7 / 8
------------------------------------	--	--------------

6.4 PROCESSUS POST-ANALYTIQUE

6.4.1 Visualisation, saisie et validation techniques des CIQ

Les résultats sont consultables sur le logiciel Light Cyler 480 (Roche Diagnostics) (pièce PII-332) (<http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-023>).

Le résultat de Ct du CIQ est saisi manuellement dans le module MOLIS QC, puis validés techniquement avec contrôle de la saisie (<http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-033>).

6.2.2 Visualisation et validation technique des résultats patients

Si les résultats du CIQI et du témoin négatif sont valides, les résultats patients de la série peuvent être retranscrits sur le SIL MOLIS. Les feuilles de résultats sont imprimées afin que le biologiste contrôle les résultats lors de sa validation.

6.2.3 Validation biologique des résultats

Les résultats sont validés biologiquement par un biologiste habilité selon la procédure <http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-024>. Les résultats des CIQ sont validés biologiquement sur le module MOLIS QC (<http://srv-kalilab/IT-PTI-INFO-009>). Les résultats patients sont ensuite validés sur le SIL MOLIS (secteur de validation MVAL_CIST). Le biologiste paraphe les feuilles de résultats.

6.2.4 Archivage des résultats

- **Archivage papier** : après validation biologique, les listes de travail et les feuilles de résultats sont archivées dans le DE « Résultats d'analyses » (<http://srv-kalilab/DE-PTI-QUAL-038>), en pièce PII 336, puis dans les archives centrales (cf. <http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-004>).
- **Archivage informatique** : les résultats sont archivés dans le SIL MOLIS. Les résultats bruts peuvent être également consultés sur le logiciel LC 480 pendant 6 mois. Ensuite, ce logiciel compresse et transfère automatiquement les résultats dans le dossier **D:/ARCHIVE** de l'ordinateur HP RP5700 relié au LC 480. Ces résultats compressés et archivés peuvent être consultés grâce au logiciel **ARCHIVE VIEWER** installé sur la session **USER DEFINED WORKFLOW** de cet ordinateur.

7 CONDUITE A TENIR EN CAS D'ANOMALIE

En cas d'anomalie au niveau des CIQ, tracer une non-conformité dans KaliLab (cf. utilisation pratique de KaliLab <http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-QUAL-006>) en se référant à la procédure générale de gestion de non-conformités (<http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-003>) et informer le biologiste responsable du secteur pour connaître la conduite à tenir. La gestion des CIQ est décrite dans la procédure <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-122> .

En cas d'impossibilité prolongée (≥ 1 semaine) de réaliser les analyses (panne de l'automate, panne informatique, rupture de stock de réactifs, problèmes techniques...), une note d'information sera diffusée aux prescripteurs pour les informer de l'arrêt temporaire de la réalisation de ces analyses par le laboratoire. Une nouvelle note sera diffusée lors de la reprise de ces analyses.

Pour toute autre anomalie, se référer à la procédure <http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-003> et informer le biologiste responsable du secteur pour connaître la conduite à tenir.

Fin de document

Annexe 2: Résultats sur selles de patients de la PCR visant *stx1*, *stx2* et *eae*, et de la PCR visant les sérogroupes

	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O157
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O26
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O111
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O145
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O103
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O45
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O121
	Association probable entre <i>stx1/stx2/eae</i> et O80
	Association douteuse entre <i>stx1/stx2/eae</i> et le séro groupe

Patient	Numéro Molis	Sexe	Age	Service	Clinique	stx1	stx2	eae	O157	O26	O111	O145	O103	O45	O121	O80
1	8254-1532	F	0	Hospitalisation pédiatrie	SHU	-	15,91	15,32	-	-	-	-	-	-	-	-
2	9014-2914	M	0	Réanimation pédiatrique	SHU	-	27,38	27,77	-	29,8	-	-	-	-	-	-
3	9054-1617	F	0	Urgences pédiatriques	SHU	-	15,34	15,49	-	-	-	-	-	-	-	-
4	9240-2530	M	0	Réanimation pédiatrique	SHU	-	15,76	18,18	-	-	-	-	-	-	20,58	-
5	9109-2277	F	1	Réanimation pédiatrique	SHU	-	32,91	31,52	-	35,27	-	-	-	-	-	-
6	9165-1533	F	1	Hospitalisation pédiatrie	SHU	-	21,83	21,89	-	23,52	-	-	-	33,56	-	27,76
7	9271-1460	F	1	Réanimation pédiatrique	SHU	-	35,29	34,34	-	-	-	-	-	-	-	-
8	9362-1112	M	1	Hospitalisation pédiatrie	SHU	-	30,91	28,57	-	31,20	-	-	-	-	-	-
9	216-3882	F	1	Hospitalisation pédiatrie	SHU	-	25,40	26,08	-	27,30	-	-	-	-	-	-
10	8292-98	F	2	Urgences pédiatriques	SHU	-	38,74	36,82	-	-	-	-	-	-	-	-
11	sept-82	F	2	Réanimation pédiatrique	SHU	24,11	23,78	23,93	-	25,67	-	-	-	-	-	-
12	9009-50	M	3	Urgences pédiatriques	SHU	-	16,35	16,23	-	-	-	18,85	-	-	-	22,82
13	9026-1364	M	3	Urgences pédiatriques	SHU	-	16,72	16,55	-	-	-	-	-	-	-	17,49
14	200-905	F	10	Urgences pédiatriques	SHU	-	23,27	21,74	-	23,01	-	-	-	-	-	-
15	67-830	F	47	UTO	SHU	-	25,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	9021-5066	F	49	UTO	SHU	31,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	8326-1953	F	63	Néphrologie	SHU	15,38	-	15,40	-	16,88	-	-	-	-	-	-

18	9326-3908	M	66	UTO	SHU	-	19,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	9005-1025	F	69	Hépatogastroentérologie	SHU	-	18,76	18,46	-	21,11	-	-	-	-	-	23,77
20	9356-481	M	81	UTO	SHU	-	15,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	9030-3441	M	0	Urgences pédiatriques	diarrhées glairo-sanglantes	27,65	-	21,78	-	-	-	-	-	-	-	-
22	9096-1671	F	0	Réanimation pédiatrique	diarrhées glairo-sanglantes	37,27	36,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	9233-460	M	0	Urgences pédiatriques	diarrhées glairo-sanglantes	32,35	-	31,00	-	24,35	-	-	36,21	-	-	-
24	9284-1915	M	0	Hospitalisation pédiatrie	diarrhées glairo-sanglantes	-	39,89	-	-	-	-	-	-	-	-	33,96
25	8232-4053	F	1	Hospitalisation pédiatrie	diarrhées glairo-sanglantes	19,09	-	19,43	-	20,90	-	-	-	37,22	-	-
26	9230-765	M	5	Hospitalisation pédiatrie	diarrhées glairo-sanglantes	29,27	29,21	30,11	-	-	-	-	-	-	40,00	26,46
27	9252-1734	F	13	Urgences pédiatriques	diarrhées glairo-sanglantes	35,07	-	25,05	32,49	-	32,69	-	-	-	32,84	-
28	9259-3415	M	15	Hospitalisation pédiatrie	diarrhées glairo-sanglantes	35,25	-	32,57	-	-	-	-	38,70	-	-	-
29	8323-4118	F	22	Hépatogastroentérologie	diarrhées glairo-sanglantes	25,60	24,97	25,65	27,37	-	-	-	-	-	-	-
30	9337-4301	F	27	Urgences	diarrhées glairo-sanglantes	-	39,12	19,80	-	-	-	-	-	-	-	-
31	9262-3498	F	34	Hépatogastroentérologie	diarrhées glairo-sanglantes	33,01	36,92	21,75	-	-	-	23,09	33,12	-	-	-
32	9077-452	F	35	Hépatogastroentérologie	diarrhées glairo-sanglantes	33,54	-	21,27	-	-	-	-	-	34,57	-	-
33	56-4329	F	37	Chirurgie cardiovasculaire	diarrhées glairo-sanglantes	18,41	-	18,63	-	-	-	-	29,89	-	-	-
34	9046-4378	F	38	Urgences	diarrhées glairo-sanglantes	32,98	-	-	-	-	-	-	-	24,89	-	-
35	9252-102	F	50	Néphrologie	diarrhées glairo-sanglantes	-	31,23	30,83	-	-	-	-	-	-	-	-
36	9043-4395	M	57	Hépatogastroentérologie	diarrhées glairo-sanglantes	-	36,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	149-2408	F	57	Hépatogastroentérologie	diarrhées glairo-sanglantes	-	30,87	31,09	33,96	-	-	-	-	-	-	-
38	8236-2965	M	64	Hématologie	diarrhées glairo-sanglantes	-	33,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	9155-2106	M	66	Dermatologie	diarrhées glairo-sanglantes	38,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	9186-3423	M	77	Urgences	diarrhées glairo-sanglantes	23,85	23,11	-	-	-	-	27,29	-	-	-	-
41	9209-851	F	85	Hospitalisation cardiovasculaire	diarrhées glairo-sanglantes	-	20,85	20,31	-	-	-	-	-	-	-	-
42	9297-1615	M	88	Médecine interne	diarrhées glairo-sanglantes	35,28	33,69	-	-	-	-	28,20	-	40,00	-	-
43	8333-1011	F	92	Urgences	diarrhées glairo-sanglantes	26,21	26,43	-	-	-	-	24,85	-	-	-	-
44	8192-414	M	77	Urgences	diarrhées glairo-sanglantes	32,59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	8235-2197	F	0	Hospitalisation pédiatrie	Diarrhées simples	-	18,02	-	-	-	-	-	-	32,48	-	-
46	9115-4199	M	0	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	25,12	25,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	9225-3568	F	0	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	28,28	28,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	9251-1025	F	0	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	36,11	36,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	15-3995	F	0	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	17,21	16,79	18,13	-	-	-	-	-	-	-
50	68-1424	M	0	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	34,42	34,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-

51	8294-17	M	1	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	15,51	15,87	15,69	-	-	17,30	-	-	-	-	-
52	8313-2251	F	1	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	40,72	39,56	-	-	-	-	-	-	30,93	-	-
53	8360-2855	M	1	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	21,14	20,83	-	-	-	-	-	-	-	22,16
54	9230-1029	M	1	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	30,20	-	21,01	-	24,88	-	-	-	-	-	-
55	9265-396	M	1	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	16,22	16,92	-	-	-	-	-	-	-	-
56	9061-1825	M	2	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	35,55	37,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	9315-2018	M	3	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	29,27	17,81	19,25	-	-	-	-	-	-	-
58	9226-100	F	4	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	29,18	29,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	8211-1797	M	6	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	32,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	9185-3731	F	8	Hospitalisation pédiatrie	Diarrhées simples	32,38	32,59	32,72	-	-	-	-	-	-	-	-
61	8221-3131	M	9	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	34,20	-	-	-	-	-	28,96	-	31,94	-	32,26
62	9333-3684	M	9	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	28,07	27,79	-	-	-	-	-	-	-	-
63	9215-105	M	12	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	-	21,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	8217-185	M	14	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	28,79	29,5	-	-	-	-	-	31,53	-	-	-
65	8307-1565	M	15	Urgences pédiatriques	Diarrhées simples	27,02	-	27,86	-	-	-	-	-	-	-	-
66	9331-2508	F	19	Urologie	Diarrhées simples	35,41	20,12	32,15	-	-	-	-	-	-	-	-
67	9213-1376	F	23	Maladies infectieuses	Diarrhées simples	39,52	37,4	27,49	-	31,98	-	-	37,77	34,81	39,17	32,22
68	203-4775	F	24	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	-	35,79	30,24	-	37,83	-	-	-	36,40	-	18,84
69	9-53	F	38	Hématologie	Diarrhées simples	34,19	-	23,54	-	-	-	-	-	-	-	-
70	9276-2099	F	38	Urgences	Diarrhées simples	35,56	-	26,57	-	-	-	-	-	-	-	-
71	147-97	M	38	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	24,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	8226-2694	F	40	Hématologie	Diarrhées simples	36,41	-	-	-	-	-	29,35	33,81	-	37,89	-
73	8290-3947	M	40	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	31,09	-	-	-	-	-	36,44	-	-	-	-
74	8317-2575	F	44	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	22,56	22,52	28,77	-	-	-	-	-	-	-	-
75	9119-4058	F	44	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	25,40	24,94	31,11	-	-	-	-	33,20	-	-	-
76	9173-1288	M	45	Urgences	Diarrhées simples	24,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	9281-998	M	51	UTO	Diarrhées simples	-	15,35	15,45	-	-	-	-	-	-	-	16,89
78	9364-182	M	51	Urgences	Diarrhées simples	-	29,06	29,00	-	-	-	-	-	-	-	32,74
79	8210-959	F	52	Urgences	Diarrhées simples	28,16	28,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	8211-2843	M	52	Hématologie	Diarrhées simples	-	38,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	9100-2978	M	53	Hématologie	Diarrhées simples	-	29,74	26,69	-	-	-	-	-	-	-	-
82	189-4419	F	53	UTO	Diarrhées simples	30,83	34,71	34,40	-	-	-	31,54	-	-	-	-
83	197-107	F	53	Hématologie	Diarrhées simples	15,95	-	16,39	-	17,68	-	-	-	-	-	-
84	9272-56	M	54	UTO	Diarrhées simples	-	30,58	28,36	-	-	-	-	-	-	-	-

85	194-1268	M	54	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	25,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	8212-4052	F	57	Hématologie	Diarrhées simples	-	23,91	23,35	-	-	-	-	-	-	-	25,31
87	9127-2401	M	57	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	-	38,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	8211-2158	F	58	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	-	26,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	9058-1571	F	58	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	-	20,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	152-1575	M	59	Oncologie	Diarrhées simples	39,93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	8236-401	F	60	Hématologie	Diarrhées simples	-	33,67	-	-	-	-	-	-	27,48	27,28	-
92	9055-123	M	60	Hématologie	Diarrhées simples	-	36,56	-	-	-	-	-	-	-	-	32,16
93	9052-2512	F	61	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	-	22,16	21,56	-	-	-	-	-	-	-	-
94	9240-89	F	61	Hématologie	Diarrhées simples	23,11	22,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	8211-2847	M	62	Hématologie	Diarrhées simples	-	36,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	9054-969	M	62	Néphrologie	Diarrhées simples	35,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	164-4033	M	63	Oncologie	Diarrhées simples	37,38	37,38	38,98	-	-	-	-	-	-	-	-
98	197-104	F	65	Hématologie	Diarrhées simples	32,44	-	31,96	-	-	-	-	-	-	30,82	-
99	8243-2456	F	66	Maladies infectieuses	Diarrhées simples	31,85	30,52	30,56	-	-	-	-	-	-	-	-
100	9064-1763	M	66	Urgences	Diarrhées simples	33,16	-	28,23	-	-	-	-	-	-	-	-
101	9346-2498	M	66	Urgences Ranguel	Diarrhées simples	31,88	33,48	31,89	38,47	-	-	-	-	-	-	-
102	8211-2862	M	67	Hématologie	Diarrhées simples	-	38,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	8319-2762	M	67	Hématologie	Diarrhées simples	-	34,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	9220-2558	F	68	Hématologie	Diarrhées simples	34,18	-	26,97	-	-	-	-	35,79	-	-	-
105	9267-1747	M	68	Hospitalisation Lavaur	Diarrhées simples	28,72	29,03	31,70	-	-	-	33,08	38,89	-	-	31,84
106	9185-3811	F	68	CH Muret	Diarrhées simples	-	22,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	9262-4490	F	68	UTO	Diarrhées simples	34,24	-	33,88	-	-	-	-	-	-	-	-
108	8208-1661	M	69	Hématologie	Diarrhées simples	-	35,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	8340-867	M	70	Urgences	Diarrhées simples	-	35,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	165-1483	M	70	Hématologie	Diarrhées simples	33,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	8311-2893	M	71	Hospitalisation cardiovasculaire	Diarrhées simples	-	35,25	26,51	-	-	-	-	-	-	-	-
112	9283-1397	F	71	Oncologie	Diarrhées simples	29,07	-	32,07	-	34,87	-	35,30	-	-	-	-
113	121-2596	M	72	Oncologie	Diarrhées simples	-	36,08	36,54	-	-	-	-	-	38,44	-	-
114	165-1359	F	72	Urgences	Diarrhées simples	-	38,95	-	-	-	-	-	-	38,70	-	-
115	9153-86	M	73	Médecine interne	Diarrhées simples	29,78	-	30,75	-	-	-	-	-	-	-	-
116	8236-869	M	74	Médecine interne	Diarrhées simples	-	34,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	9271-1191	M	76	Dermatologie	Diarrhées simples	26,43	24,59	-	-	-	-	-	-	26,32	-	-
118	8217-32	F	77	Urgences	Diarrhées simples	33,35	32,77	-	-	-	-	-	-	37,67	-	-

119	9165-2592	M	77	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	29,80	29,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	9288-3463	M	77	Hépatogastroentérologie	Diarrhées simples	24,03	37,48	-	-	-	-	-	-	40,00	-	31,33
121	8343-1582	F	78	Urgences	Diarrhées simples	28,74	-	28,21	-	-	-	-	-	-	-	-
122	8310-2475	F	81	Médecine interne	Diarrhées simples	-	22,51	22,02	-	-	-	-	-	-	-	-
123	9211-51	M	81	UTO	Diarrhées simples	24,86	-	25,26	-	-	-	27,93	-	-	-	-
124	120-1923	M	81	Urgences	Diarrhées simples	-	18,68	18,08	-	-	-	-	-	20,04	-	-
125	3-90	M	82	Urgences	Diarrhées simples	29,81	40,31	25,59	-	-	-	-	-	-	-	-
126	9234-4012	F	82	Urgences	Diarrhées simples	36,31	32,33	25,90	-	-	-	-	-	-	-	-
127	9286-132	F	82	Urgences	Diarrhées simples	-	33,54	-	-	-	-	30,95	39,41	29,60	-	-
128	8212-3644	F	85	Urgences	Diarrhées simples	-	24,99	24,49	-	-	-	-	-	-	-	-
129	108-3041	M	85	Urgences	Diarrhées simples	-	36,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130	189-3726	F	85	Urgences	Diarrhées simples	36,68	36,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	108-1340	F	87	Médecine interne	Diarrhées simples	18,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
132	9066-2675	M	89	SSR	Diarrhées simples	-	36,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
133	9360-52	M	91	Urgences	Diarrhées simples	-	28,9	-	-	-	-	-	40,00	-	-	-
134	9288-4098	M	93	Médecine interne	Diarrhées simples	-	22,81	21,50	-	-	-	-	-	-	-	28,36
135	165-43	F	94	Urgences	Diarrhées simples	39,03	-	38,67	-	-	-	-	-	-	-	-
136	8242-1509	M	0	hospitalisation pédiatrie	absence de diarrhées	33,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
137	9308-79	M	0	Urgences pédiatriques	absence de diarrhées	23,18	-	32,14	-	-	-	-	-	-	22,84	-
138	147-2240	F	4	hospitalisation pédiatrie	absence de diarrhées	31,18	-	37,24	-	-	-	-	40,00	-	36,74	-
139	9242-3105	F	6	Hématologie	absence de diarrhées	36,73	-	-	-	-	17,33	-	-	-	-	-
140	8235-3974	F	13	hospitalisation pédiatrie	absence de diarrhées	17,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
141	9244-1071	M	39	Médecine interne	absence de diarrhées	-	30,87	27,44	32,75	-	-	-	-	38,11	-	-
142	183-55	M	41	Urgences	absence de diarrhées	-	21,83	29,39	-	-	-	-	-	-	-	-
143	9330-2088	F	47	Hématologie	absence de diarrhées	34,40	40,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	9359-1455	M	47	Hématologie	absence de diarrhées	-	35,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	79-1574	M	53	Médecine interne	absence de diarrhées	34,23	-	22,82	-	-	-	-	-	-	-	-
146	8197-3584	M	55	pneumologie	absence de diarrhées	-	25,3	37,40	-	-	-	-	-	-	-	-
147	9362-1860	F	55	UTO	absence de diarrhées	-	38,69	-	-	-	-	-	-	-	-	33,70
148	8344-3502	M	56	Urgences	absence de diarrhées	-	35,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
149	8299-2411	M	62	Réanimation	absence de diarrhées	38,45	-	21,88	-	39,22	-	-	-	-	-	-
150	9137-444	F	63	Hématologie	absence de diarrhées	25,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
151	9232-1418	M	63	Hématologie	absence de diarrhées	33,65	-	26,79	-	-	-	-	-	-	-	-
152	9294-4261	M	63	Médecine interne	absence de diarrhées	17,04	17,04	-	-	-	-	30,78	-	-	-	-

153	9335-1347	M	66	Hépatogastroentérologie	absence de diarrhées	34,56	16,33	33,35	-	-	-	-	-	-	-	-
154	8327-3914	F	67	Maladies infectieuses	absence de diarrhées	33,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
155	189-246	M	69	Réanimation	absence de diarrhées	40,94	31,35	30,27	-	-	-	-	-	32,33	-	-
156	171-2780	F	74	Urgences	absence de diarrhées	-	14,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
157	9103-112	M	76	Oncologie	absence de diarrhées	-	38,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	9348-716	F	86	Urgences	absence de diarrhées	32,40	-	29,22	-	31,55	-	-	36,76	-	-	32,68
159	9192-189	M	0	Urgences pédiatriques	informations manquantes	-	28,75	21,75	30,71	-	-	-	-	-	-	-
160	179-1790	M	0	hospitalisation pédiatrie	informations manquantes	38,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
161	9008-152	M	1	Urgences pédiatriques	informations manquantes	-	36,13	20,79	-	-	-	-	-	-	-	34,37
162	9347-2850	F	1	CH Montauban	informations manquantes	-	25,74	26,05	-	-	-	-	-	-	-	27,35
163	9147-2189	F	2	Hospitalisation Lavaur	informations manquantes	-	29,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
164	168-4981	F	2	Urgences pédiatriques	informations manquantes	22,15	21,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
165	8243-1922	M	18	Médecine interne	informations manquantes	-	40,51	39,00	-	-	-	-	-	-	-	-
166	8226-145	F	19	Urgences	informations manquantes	29,54	28,63	39,81	-	-	-	-	-	-	-	-
167	188-2343	F	19	Urgences	informations manquantes	-	22,33	27,60	-	-	-	-	-	-	-	-
168	162-4116	M	20	Réanimation	informations manquantes	-	32,17	31,74	-	-	-	-	-	-	-	-
169	9069-87	M	22	Urgences	informations manquantes	37,05	-	36,13	-	-	-	-	-	-	-	-
170	121-2777	F	25	CH Montauban	informations manquantes	-	37,44	37,49	-	-	-	-	-	36,24	-	-
171	204-2303	M	29	Médecine interne	informations manquantes	-	38,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
172	9205-2636	M	31	Médecine interne	informations manquantes	-	32,37	26,20	-	-	-	-	-	-	-	-
173	8256-2398	M	33	Accueil soins patients sourds	informations manquantes	-	31,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
174	9075-1033	F	41	Médecine interne	informations manquantes	-	41,02	39,38	-	-	-	32,10	-	-	-	-
175	88-1282	F	49	Médecine interne	informations manquantes	31,02	-	19,48	-	35,67	-	-	-	-	35,27	-
176	8242-4082	F	53	Médecine interne	informations manquantes	-	35,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
177	9121-1040	M	53	Médecine interne	informations manquantes	25,86	-	26,24	-	-	-	-	-	-	-	-
178	148-2254	M	53	CH périphérique	informations manquantes	38,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	8211-1344	F	58	Hospitalisation Lavaur	informations manquantes	-	30,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	8211-2561	F	62	CH Cahors	informations manquantes	-	22,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
181	9151-2503	F	70	Médecine interne	informations manquantes	36,87	37,77	31,43	-	-	-	23,06	-	-	-	-
182	8211-2219	M	71	Réanimation	informations manquantes	36,18	-	35,99	-	-	-	37,18	-	-	-	-
183	8237-765	M	71	Médecine interne	informations manquantes	28,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
184	9176-1845	M	72	Hospitalisation Lavaur	informations manquantes	-	20,13	-	-	-	-	-	-	28,90	-	-
185	9276-1685	M	72	Hospitalisation Lavaur	informations manquantes	-	25,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-

186	8207-1727	F	79	Hospitalisation cardiovasculaire	informations manquantes	-	38,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
187	9307-1555	M	81	Urgences	informations manquantes	30,13	32,66	39,81	-	-	-	-	32,50	-	-	-
188	8287-1686	M	88	Médecine interne	informations manquantes	25,54	-	26,64	30,29	-	-	-	-	-	33,80	-
189	9059-2537	F	88	Médecine interne	informations manquantes	35,20	-	35,37	-	-	-	-	40,00	-	-	-
190	8328-1022	F	96	Médecine interne	informations manquantes	28,43	28,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Annexe 3: Résultats sur selles des témoins de la PCR visant *stx1*, *stx2* et *eae* et de la PCR visant les sérogroupes

Témoin	Numéro	sexe	Âge	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	O157	O26	O145	O111	O103	O45	O121	O80
1	8193-1778	F	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8195-1198	F	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	9174-1099	F	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	9176-403	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	9177-56	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	9180-1326	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	9180-1848	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	9187-1540	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	9186-344	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	9188-1874	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	9192-4271	F	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	9193-58	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	9203-3606	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	9206-2936	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	8194-3613	F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	9175-3291	M	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	9176-2249	F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	9177-2935	F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	9179-3284	F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	9177-2534	M	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	9188-1509	F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	39,33	-	-
22	9202-987	M	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	8193-2689	F	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	9201-1458	F	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	9206-1779	F	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	9175-3443	M	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	9197-1490	F	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	9171-3908	M	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	9177-2121	M	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	9187-1303	F	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	8192-1831	F	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	9171-1492	F	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	9174-1141	F	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	9178-4541	M	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	8194-3409	M	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	8194-2327	M	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	9179-1041	M	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	9172-3539	M	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	9178-3023	M	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	9179-3509	F	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	8193-3755	M	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	9172-2479	F	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	8194-3975	M	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

44	9173-1625	M	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	8194-4030	M	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	8192-126	M	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	8192-2018	M	65	-	-	-	-	-	-	-	36.40	-	-	-
48	9176-4881	F	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	8192-127	F	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	9173-1878	F	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	8192-1390	F	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	9176-9	M	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	9178-2858	F	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	9179-3938	F	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	8193-4060	M	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	9171-1029	F	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	9171-4599	F	84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	9171-2540	M	86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	9179-358	F	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	8194-552	M	89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliographie

- [1] M. Agger et al., « Antibiotic Treatment of Verocytotoxin-Producing *Escherichia Coli* (VTEC) Infection: A Systematic Review and a Proposal », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, n° 9, septembre 2015, p. 2440-46. doi:10.1093/jac/dkv162.
- [2] M.J Alam et al., « Seasonal Prevalence of *Escherichia Coli* O157:H7 in Beef Cattle Feces† », *Journal of Food Protection*, vol. 69, n° 12, décembre 2006, p. 3018-20. doi:10.4315/0362-028X-69.12.3018.
- [3] I. Alejo-Cancho et al., « Evaluation of a multiplex panel for the diagnosis of acute infectious diarrhea in immunocompromised hematologic patients », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 11, novembre 2017. doi:10.1371/journal.pone.0187458.
- [4] B. Amézquita-López et al., « Isolation, Genotyping and Antimicrobial Resistance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* », *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 51, n° 4, août 2018, p. 425-34. doi:10.1016/j.jmii.2017.07.004.
- [5] J. Bai et al., « Applicability of a Multiplex PCR to Detect the Seven Major Shiga Toxin–Producing *Escherichia Coli* Based on Genes That Code for Serogroup-Specific O-Antigens and Major Virulence Factors in Cattle Feces », *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 9, n° 6, juin 2012, p. 541-48. doi:10.1089/fpd.2011.1082.
- [6] G. Barkocy-Gallagher et al., « Seasonal Prevalence of Shiga Toxin–Producing *Escherichia Coli*, Including O157:H7 and Non-O157 Serotypes, and Salmonella in Commercial Beef Processing Plants† », *Journal of Food Protection*, vol. 66, n° 11, novembre 2003, p. 1978-86. doi:10.4315/0362-028X-66.11.1978.
- [7] R. Barlow et al., « Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Serotypes in Australian Beef Cattle ». *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 7, n° 10, octobre 2010, p. 1239-45. DOI.org (Crossref), doi:10.1089/fpd.2010.0574.
- [8] L. Beutin et al., « Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, n° 3, mars 2004, p. 1099-108. doi:10.1128/JCM.42.3.1099-1108.2004.
- [9] L. Beutin et al., « Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli*, Causes and Effects of the Rise of a Human Pathogen », *Journal of Veterinary Medicine Series B*, vol. 53, n° 7, septembre 2006, p. 299-305. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00968.x.
- [10] D. Bibbal et al., « Intimin Gene (*Eae*) Subtype-Based Real-Time PCR Strategy for Specific Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in Cattle Feces », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, n° 3, février 2014, p. 1177-84. doi:10.1128/AEM.03161-13.
- [11] D. Bibbal et al., « Prevalence of Carriage of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among Slaughtered Adult Cattle in France », *Applied and Environmental Microbiology*, édité par J. Björkroth, vol. 81, n° 4, février 2015, p. 1397-405. doi:10.1128/AEM.03315-14.
- [12] M. Bielaszewska et al., « Characterisation of the *Escherichia Coli* Strain Associated with an Outbreak of Haemolytic Uraemic Syndrome in Germany, 2011: A Microbiological Study », *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 11, n° 9, septembre 2011, p. 671-76. doi:10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
- [13] J. Bosilevac et al., « Predicting the Presence of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* in Ground Beef by Using Molecular Tests for Shiga Toxins, Intimin, and O Serogroups », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, n° 19, octobre 2012, p. 7152-55. doi:10.1128/AEM.01508-12.
- [14] M. Bruyand et al., « Hemolytic Uremic Syndrome Due to Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Infection », *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 48, n° 3, mai 2018, p. 167-74. doi:10.1016/j.medmal.2017.09.012.
- [15] M. Bruyand et al., « Paediatric Haemolytic Uraemic Syndrome Related to Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*, an Overview of 10 Years of Surveillance in France, 2007 to 2016 », *Eurosurveillance*, vol. 24, n° 8, février 2019. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068.
- [16] A. Cabal et al., « Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance of STEC Strains Isolated from Healthy Cattle in 2011 and 2013 in Spain », *Epidemiology and Infection*, vol. 144, n° 14, octobre 2016, p. 2956-66. doi:10.1017/S0950268816001370.
- [17] L. Chui et al., « Comparison of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Detection Methods Using Clinical Stool Samples », *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 12, n° 4, juillet 2010, p. 469-75. doi:10.2353/jmoldx.2010.090221.
- [18] A. Clements et al., « Infection Strategies of Enteric Pathogenic *Escherichia Coli* », *Gut Microbes*, vol. 3, n° 2, mars 2012, p. 71-87. doi:10.4161/gmic.19182.
- [19] P. Coppo et al., « Purpura thrombotique thrombocytopenique et autres syndromes de microangiopathie thrombotique », *EMC - Hématologie*, vol. 2, n° 1, mars 2005, p. 14-34. doi:10.1016/j.emch.2004.12.002.

- [20] M.A Croxen et al., « Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia Coli », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, n° 4, octobre 2013, p. 822-80. doi:10.1128/CMR.00022-13.
- [21] D. Dawson et al., « Investigating Behavioral Drivers of Seasonal Shiga-Toxigenic Escherichia Coli (STEC) Patterns in Grazing Cattle Using an Agent-Based Model », *PLOS ONE*, vol. 13, n° 10, octobre 2018, p. e0205418. doi:10.1371/journal.pone.0205418.
- [22] C. DebRoy et al., « Development of PCR Assays Targeting Genes in O-Antigen Gene Clusters for Detection and Identification of Escherichia Coli O45 and O55 Serogroups », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, n° 8, août 2005, p. 4919-24. doi:10.1128/AEM.71.8.4919-4924.2005.
- [23] K. De Rauw et al., « Twenty-seven years of screening for Shiga toxin-producing Escherichia coli in a university hospital. Brussels, Belgium, 1987-2014 », *PLoS ONE*, vol. 13, n° 7, juillet 2018, doi:10.1371/journal.pone.0199968.
- [24] G ; Duffy, et al., « Veterinary Public Health Approach to Managing Pathogenic Verocytotoxigenic Escherichia Coli in the Agri-Food Chain ». *Microbiology Spectrum*, vol. 2, n° 5, octobre 2014, doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0023-2013.
- [25] A. Ekiri et al., « Isolation and Characterization of Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Serogroups O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 Shed from Range and Feedlot Cattle from Postweaning to Slaughter », *Journal of Food Protection*, 2014.
- [26] P. S. Ekong et al., « Prevalence and Concentration of Escherichia Coli O157 in Different Seasons and Cattle Types Processed in North America: A Systematic Review and Meta-Analysis of Published Research », *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 121, n° 1-2, septembre 2015, p. 74-85. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.06.019.
- [27] F. Fakhouri et al., « Haemolytic Uraemic Syndrome », *The Lancet*, vol. 390, n° 10095, août 2017, p. 681-96. doi:10.1016/S0140-6736(17)30062-4.
- [28] W. Ferens et al., « Escherichia Coli O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection », *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, n° 4, avril 2011, p. 465-87. doi:10.1089/fpd.2010.0673.
- [29] L. Fierz et al., « Characteristics of Shigatoxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated during 2010–2014 from Human Infections in Switzerland », *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, août 2017, p. 1471. doi:10.3389/fmicb.2017.01471.
- [30] C. Frank et al., « Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing Escherichia Coli O104:H4 Outbreak in Germany », *New England Journal of Medicine*, vol. 365, n° 19, novembre 2011, p. 1771-80. doi:10.1056/NEJMoa1106483.
- [31] S. Freedman et al., « Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-Analysis », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, n° 10, mai 2016, p. 1251-58. doi:10.1093/cid/ciw099.
- [32] C. Fuller et al., « Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency », *Infection and Immunity*, édité par S. R. Blanke, vol. 79, n° 3, mars 2011, p. 1329-37. doi:10.1128/IAI.01182-10.
- [33] L. Gould et al., « Increased Recognition of Non-O157 Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli Infections in the United States During 2000–2010: Epidemiologic Features and Comparison with E. Coli O157 Infections », *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 10, n° 5, mai 2013, p. 453-60. doi:10.1089/fpd.2012.1401.
- [34] T. Grys et al., « Rapid and Sensitive Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli from Nonenriched Stool Specimens by Real-Time PCR in Comparison to Enzyme Immunoassay and Culture », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, n° 7, juillet 2009, p. 2008-12. doi:10.1128/JCM.02013-08.
- [35] M. Guirro et al., « Humoral Immune Response to Shiga Toxin 2 (Stx2) among Brazilian Urban Children with Hemolytic Uremic Syndrome and Healthy Controls », *BMC Infectious Diseases*, vol. 14, n° 1, décembre 2014, p. 320. doi:10.1186/1471-2334-14-320.
- [36] G. Gunn et al., « An Investigation of Factors Associated with the Prevalence of Verocytotoxin Producing Escherichia Coli O157 Shedding in Scottish Beef Cattle », *The Veterinary Journal*, vol. 174, n° 3, novembre 2007, p. 554-64. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.024.
- [37] C. Gyles et al., « Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli: An Overview1 », *Journal of Animal Science*, vol. 85, n° suppl_13, mars 2007, p. E45-62. doi:10.2527/jas.2006-508.
- [38] E. Hofer et al., « Application of a Real-Time PCR-Based System for Monitoring of O26, O103, O111, O145 and O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Cattle at Slaughter: O26, O103, O111, O145 and O157 STEC in Cattle », *Zoonoses and Public Health*, vol. 59, n° 6, septembre 2012, p. 408-15. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01468.x.
- [39] H. Hussein et al., « Prevalence and Pathogenicity of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Beef Cattle and Their Products1,2 », *Journal of Animal Science*, vol. 85, n° suppl_13, mars 2007, p. E63-72. doi:10.2527/jas.2006-421.

- [40] B. Ingelbeen et al., « Emerging Shiga-Toxin-Producing Escherichia Coli Serogroup O80 Associated Hemolytic and Uremic Syndrome in France, 2013–2016: Differences with Other Serogroups », *PLOS ONE*, vol. 13, n° 11, novembre 2018, p. e0207492. doi:10.1371/journal.pone.0207492.
- [41] M. Islam et al., « Regional Variation in the Prevalence of E. Coli O157 in Cattle: A Meta-Analysis and Meta-Regression », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 4, avril 2014, p. e93299. doi:10.1371/journal.pone.0093299.
- [42] D. Jandhyala et al., « Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli O104:H4 ». *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 27, n° 3, septembre 2013, p. 631-49. doi:10.1016/j.idc.2013.05.002.
- [43] C. Jenkins et al., « Escherichia Coli Serogroup O26 ? A New Look at an Old Adversary », *Journal of Applied Microbiology*, juillet 2007. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03465.x.
- [44] K. Johnson et al., « The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 43, n° 12, décembre 2006, p. 1587-95. doi:10.1086/509573.
- [45] G. Jones et al., *Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez l'enfant de moins de 15 ans en France en 2018*. p. 5, 2019, Santé Publique France
- [46] M. Joris et al., « Occurrence and Virulence Patterns of E. Coli O26, O103, O111 and O145 in Slaughter Cattle », *Veterinary Microbiology*, vol. 151, n° 3-4, août 2011, p. 418-21. doi:10.1016/j.vetmic.2011.04.003.
- [47] J. Kaper et al., « Pathogenic Escherichia Coli », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, n° 2, février 2004, p. 123-40. doi:10.1038/nrmicro818.
- [48] M. Karama et al., « Molecular Profiling and Antimicrobial Resistance of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O26, O45, O103, O121, O145 and O157 Isolates from Cattle on Cow-Calf Operations in South Africa », *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, décembre 2019, p. 11930. doi:10.1038/s41598-019-47948-1.
- [49] M. Karmali et al., « Infection by Verocytotoxin-Producing Escherichia Coli. », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 2, n° 1, janvier 1989, p. 15-38. doi:10.1128/CMR.2.1.15.
- [50] M. Karmali et al., « Verocytotoxin-Producing Escherichia Coli (VTEC) », *Veterinary Microbiology*, vol. 140, n° 3-4, janvier 2010, p. 360-70. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.011.
- [51] M. Karmali et al., « Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools », *The Lancet*, vol. 321, n° 8325, mars 1983, p. 619-20. doi:10.1016/S0140-6736(83)91795-6.
- [52] A. Kaur et al., « Haemolytic Uraemic Syndrome », *Paediatrics and Child Health*, vol. 26, n° 8, août 2016, p. 344-48. doi:10.1016/j.paed.2016.04.003.
- [53] L. King et al., « Foodborne Transmission of Sorbitol-Fermenting Escherichia Coli O157:[H7] via Ground Beef: An Outbreak in Northern France, 2011 », *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, n° 12, décembre 2014, p. O1136-44. doi:10.1111/1469-0691.12736.
- [54] E. Kintz et al. « Transmission Pathways for Sporadic Shiga-Toxin Producing E. Coli Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis », *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 220, n° 1, janvier 2017, p. 57-67. doi:10.1016/j.ijheh.2016.10.011.
- [55] J. Kirveskari et al., « Evaluation of feasibility of new multiplex real-time PCR test in screening of bacterial diarrhoeal samples », ePoster #P0870, ECCMID 2015
- [56] J. Konowalchuk et al., « Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia Coli », *Infection and Immunity*, vol. 18, n° 3, 1977, p. 775-79. doi:10.1128/IAI.18.3.775-779.1977.
- [57] A. Krüger et al., « Verotoxins in Bovine and Meat Verotoxin-Producing Escherichia Coli Isolates: Type, Number of Variants, and Relationship to Cytotoxicity », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, n° 1, janvier 2011, p. 73-79. doi:10.1128/AEM.01445-10.
- [58] A. Krüger et al., « Shiga Toxins and Stx Phages: Highly Diverse Entities », *Microbiology*, vol. 161, n° 3, mars 2015, p. 451-62. doi:10.1099/mic.0.000003.
- [59] R. La Ragione et al., « Escherichia Coli O157:H7 Colonization in Small Domestic Ruminants », *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, n° 2, mars 2009, p. 394-410. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00138.x.
- [60] A.L. Lapeyraque et al., « Eculizumab in Severe Shiga-Toxin–Associated HUS », *New England Journal of Medicine*, vol. 364, n° 26, juin 2011, p. 2561-63. doi:10.1056/NEJMc1100859.
- [61] T. Li et al., « A Potential Therapeutic Peptide-Based Neutralizer That Potently Inhibits Shiga Toxin 2 in Vitro and in Vivo », *Scientific Reports*, vol. 6, n° 1, février 2016, p. 21837. doi:10.1038/srep21837.
- [62] C. Loirat et al., « Management of Hemolytic Uremic Syndrome », *La Presse Médicale*, vol. 41, n° 3, mars 2012, p. e115-35. doi:10.1016/j.lpm.2011.11.013.
- [63] E. Loukiadis et al., Surveillance des E.coli producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011), Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°55
- [64] S. Majowicz et al., « Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis », *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, n° 6, juin 2014, p. 447-55. doi:10.1089/fpd.2013.1704.
- [65] P. Mariani-Kurkdjian et al., « Physiopathologie et virulence des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines », *Réanimation*, vol. 21, n° 3, mai 2012, p. 268-79. doi:10.1007/s13546-012-0481-x.

- [66] P. Mariani-Kurkdjian et al., « Escherichia Coli O104:H4 South-West France, June 2011 », *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 11, n° 10, octobre 2011, p. 732-33. doi:10.1016/S1473-3099(11)70266-3.
- [67] C. McGannon et al., « Different Classes of Antibiotics Differentially Influence Shiga Toxin Production », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, n° 9, septembre 2010, p. 3790-98. doi:10.1128/AAC.01783-09.
- [68] C. Mengelle et al., « Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients », *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 19, n° 10, p. 458-465, octobre 2013. doi: 10.1111/1469-0691.12255.
- [69] J. Menne et al., « Validation of Treatment Strategies for Enterohaemorrhagic Escherichia Coli O104:H4 Induced Haemolytic Uraemic Syndrome: Case-Control Study ». *BMJ*, vol. 345, n° jul19 1, juillet 2012, p. e4565-e4565. doi:10.1136/bmj.e4565.
- [70] R. Moxley et al., « Peri- and Postharvest Factors in the Control of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Beef », *Microbiology Spectrum*, vol. 2, n° 6, décembre 2014. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0017-2013.
- [71] S. Naylor et al., « Enterohaemorrhagic E. Coli in Veterinary Medicine », *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 295, n° 6-7, octobre 2005, p. 419-41. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.010.
- [72] M. Nitschke et al., « Association Between Azithromycin Therapy and Duration of Bacterial Shedding Among Patients With Shiga Toxin–Producing Enteraggregative Escherichia Coli O104:H4 », *JAMA*, vol. 307, n° 10, mars 2012, p. 1046. doi:10.1001/jama.2012.264.
- [73] L. Ogden et al., « Is the Prevalence and Shedding Concentrations of *E. Coli* O157 in Beef Cattle in Scotland Seasonal? », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 233, n° 2, avril 2004, p. 297-300. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09495.x.
- [74] Y. Ogura et al., « Comparative Genomics Reveal the Mechanism of the Parallel Evolution of O157 and Non-O157 Enterohemorrhagic Escherichia Coli », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 42, octobre 2009, p. 17939-44. doi:10.1073/pnas.0903585106.
- [75] D. Orth et al., « The Shiga Toxin Genotype Rather than the Amount of Shiga Toxin or the Cytotoxicity of Shiga Toxin in Vitro Correlates with the Appearance of the Hemolytic Uremic Syndrome », *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 59, n° 3, novembre 2007, p. 235-42. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.013.
- [76] B. Parsons et al., « Detection, Characterization, and Typing of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli », *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, avril 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.00478.
- [77] J. Paton et al., « Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infections », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, n° 3, juillet 1998, p. 450-79. doi:10.1128/CMR.11.3.450.
- [78] S. Perelle, et al., « Detection of Escherichia Coli Serogroup O103 by Real-Time Polymerase Chain Reaction », *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98, n° 5, mai 2005, p. 1162-68. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02545.x.
- [79] S. Perelle et al., « Detection by 5'-Nuclease PCR of Shiga-Toxin Producing Escherichia Coli O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, Associated with the World's Most Frequent Clinical Cases », *Molecular and Cellular Probes*, vol. 18, n° 3, juin 2004, p. 185-92. doi:10.1016/j.mcp.2003.12.004.
- [80] A. Persad et al., « Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli », *Microbiology Spectrum*, vol. 2, n° 4, août 2014. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- [81] C. Picard et al., « Pathophysiology and Treatment of Typical and Atypical Hemolytic Uremic Syndrome ». *Pathologie Biologie*, vol. 63, n° 3, juin 2015, p. 136-43. doi:10.1016/j.patbio.2015.03.001.
- [82] C. Rafat et al., « Syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) et syndromes de microangiopathie thrombotique apparentés : traitement et pronostic », *La Revue de Médecine Interne*, vol. 38, n° 12, décembre 2017, p. 833-39. doi:10.1016/j.revmed.2017.07.005.
- [83] D. Rasko et al., « Origins of the *E. Coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany », *New England Journal of Medicine*, vol. 365, n° 8, août 2011, p. 709-17. doi:10.1056/NEJMoa1106920.
- [84] A. Rintala et al., « Evaluation of a multiplex real-time PCR kit Amplidiag® Bacterial GE in the detection of bacterial pathogens from stool samples », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 128, p. 61-65, septembre 2016, doi: 10.1016/j.mimet.2016.07.009.
- [85] A. Rosales et al., « Need for Long-Term Follow-up in Enterohemorrhagic Escherichia Coli–Associated Hemolytic Uremic Syndrome Due to Late-Emerging Sequelae », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, n° 10, mai 2012, p. 1413-21. doi:10.1093/cid/cis196.
- [86] Y. Sasaki et al., « Comparison of the Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Strains O157 and O26 between Beef and Dairy Cattle in Japan », *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 75, n° 9, 2013, p. 1219-21. doi:10.1292/jvms.12-0514.
- [87] F. Scheutz et al., « Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, n° 9, septembre 2012, p. 2951-63. doi:10.1128/JCM.00860-12.

- [88] F. Scheutz et al., « Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* ». *Microbiology Spectrum*, vol. 2, n° 3, juin 2014. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013.
- [89] K. Smith et al., « Antibiotic Treatment of *Escherichia Coli* O157 Infection and the Risk of Hemolytic Uremic Syndrome, Minnesota »: *The Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 31, n° 1, janvier 2012, p. 37-41. doi:10.1097/INF.0b013e31823096a8.
- [90] K. Stanford et al., « Influence of Season and Feedlot Location on Prevalence and Virulence Factors of Seven Serogroups of *Escherichia Coli* in Feces of Western-Canadian Slaughter Cattle », *PLOS ONE*, vol. 11, n° 8, août 2016, p. e0159866. doi:10.1371/journal.pone.0159866.
- [91] P. Tarr et al., « Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Distinct Mechanisms of Pathogenesis », *Kidney International*, vol. 75, février 2009, p. S29-32. doi:10.1038/ki.2008.615.
- [92] J. Terajima et al., « Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia Coli* and Foodborne Disease: A Review ». *Food Safety*, vol. 5, n° 2, 2017, p. 35-53. doi:10.14252/foodsafetyfscj.2016029.
- [93] E. Valilis et al., « Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*—A Poorly Appreciated Enteric Pathogen: Systematic Review », *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 76, novembre 2018, p. 82-87. doi:10.1016/j.ijid.2018.09.002.
- [94] L. Vaterodt et al., « Short- and Long-Term Renal Outcome of Hemolytic-Uremic Syndrome in Childhood », *Frontiers in Pediatrics*, vol. 6, août 2018, p. 220. doi:10.3389/fped.2018.00220.
- [95] P. Walsh et al., « Eculizumab in the Treatment of Shiga Toxin Haemolytic Uraemic Syndrome », *Pediatric Nephrology*, vol. 34, n° 9, septembre 2019, p. 1485-92. doi:10.1007/s00467-018-4025-0.
- [96] S. Wang et al., « Clinical application of a multiplex genetic pathogen detection system remaps the aetiology of diarrhoeal infections in Shanghai », *Gut Pathog*, vol. 10, n° 1, p. 37, décembre 2018, doi: 10.1186/s13099-018-0264-7.
- [97] C. Wong et al., « Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in Children Infected With *Escherichia Coli* O157:H7: A Multivariable Analysis », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 55, n° 1, juillet 2012, p. 33-41. doi:10.1093/cid/cis299.
- [98] J. Zhang et al., « Identification of Diarrheagenic *Escherichia Coli* by a New Multiplex PCR Assay and Capillary Electrophoresis ». *Molecular and Cellular Probes*, vol. 49, février 2020, p. 101477. doi:10.1016/j.mcp.2019.101477.
- [99] L. Zhao et al., « Correlation Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Shedding and Faecal Bacterial Composition in Beef Cattle », *Journal of Applied Microbiology*, vol. 115, n° 2, août 2013, p. 591-603. doi:10.1111/jam.12250.
- [100] Afssa, « Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) », 2003, 220p
- [101] Afssa, « Avis aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme, rendu le 15 juillet 2008 » – Saisine 2008-SA-0122, 2008
- [102] Afssa, « Avis relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008, rendu le 27 mai 2010 » – Saisine 2010-SA-0031, 2010
- [103] Afssa, « Avis relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine, rendu le 18 mai 2017 » – Saisine 2016-SA-0121, 2016
- [104] Anses, « la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiques, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments, rendu le 11 janvier 2011 » - Saisine n° 2010-SA-003, 2012
- [105] Anses, « Avis relatif à « la définition d'un plan d'échantillonnage pour la détection d'*E. coli* O157 :H7 dans le cadre des autocontrôles en filière viande hachée bovine », rendu le 6 mai 2014 » – Saisine 2013-SA-0223 liée à la saisine 2010-SA-0031, 2014
- [106] DGAL, « Surveillance sanitaire des denrées animales et végétales en France : bilan 2018 des plans de surveillance et de contrôle », 2019
- [107] EFSA, « 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*, 2007
- [108] EFSA et ECDC, « The European Union One Health 2018 Zoonoses Report », 2019
- [109] EFSA, « Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) » *EFSA Journal*, 2013, p. 106.
- [110] Directive(CE)1999.n°2003/99/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil.

- [111] ISO/TS 13136:2012: « microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. » International Organization for Standardization, 2012, Switzerland.
- [112] EFSA, « Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). » EFSA, 2009, p.1366–1409. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1366>.
- [113] CDC. « Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). Surveillance Report. » Atlanta, 2017
- [114] Centre National de Référence des Escherichia coli, Shigella et Salmonella, « Rapport d'activité annuel 2019 sur l'année d'exercice 2018 » Institut Pasteur, 2019

ESCHERICHIA COLI PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC) : ETAT DES LIEUX AU CHU DE TOULOUSE

Présentée et soutenue publiquement par: JACQUEZ Aude

Directeur de thèse: CAVALIE Laurent, PH, Bactériologie Hygiène hospitalière

RESUME

Les STEC (*E.coli* producteurs de shigatoxines) sont responsables de diarrhées de sévérité variable, et peuvent se compliquer de SHU, causant des insuffisances rénales chez l'enfant de moins de 5 ans. Ce travail consiste en un état des lieux des souches de STEC circulant dans les selles de patients au CHU de Toulouse entre juillet 2018 et juillet 2020.

Nous avons mis en place une PCR multiplex visant les sérogroupes O157, O26, O80, O145, O45, O121, O111 et O103 sur le LightCycler 480 de Roche. Pour valider la méthode, nous avons procédé à une étape de contamination de selles négatives par des souches sérotypées de référence, afin de déterminer le lien entre la PCR multiplex visant les sérogroupes et la PCR visant les facteurs de virulence *stx1*, *stx2* et *eae*. Nous avons ensuite passé 190 selles *stx+* de patients : 84 sérogroupes ont été détectés, les plus fréquents étant O45, O26 et O80. Chez les patients souffrant de SHU, le séro groupe O26 était le plus représenté, suivi de O80. La répartition des sérogroupes est cohérente avec celle décrite par le CNR des *E.coli* (institut Pasteur, Paris).

Shiga toxin-producing E.coli (STEC) : An overview at Toulouse University Hospital

STEC (Shiga toxin-producing *E.coli*) are responsible of diarrhogenic infections and Haemolytic uraemic syndrome, which is the most common cause of acute kidney injury for children under 5 years old.

Our work is an overview of STEC strains presence within patients stools at Toulouse University Hospital Center between July 2018 and July 2020.

We developed a multiplex PCR on the LightCycler 480 (Roche), targeting O157, O26, O80, O145, O45, O121, O111 et O103 serogroups. We contaminated stools with known stains to determine the correlation between PCR targeting *stx1*, *stx2* and *eae*, and PCR targeting serogroups. Then, we analysed 190 stools *stx+* from patients : 84 serogroups have been detected by PCR, mainly O45, O26 and O80. The O26 serogroup was the most frequently found among patients with HUS, followed by O80. These results are consistent with the national reference center's publications (Institut Pasteur, Paris).

Mots-clés : *E.coli* producteurs de shigatoxines (STEC), Syndrome hémolytique et urémique (SHU), sérotypage, PCR en temps réel

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'études spécialisées de Biologie médicale

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Bactériologie CHU de Toulouse Purpan
Institut Fédératif de Biologie (IFB) 330 Avenue de Grande Bretagne 31059 Toulouse