

ESCHERICHIA COLI PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

P.Mariani-Kurkdjian, Edouard Bingen
Service de Microbiologie du Pr Bingen

CNR associé E.coli-Shigelle
Hôpital Robert Debré, Paris



E.COLI : POUVOIR PATHOGENE



Escherichia coli { 173 Ag O
80 Ag K ——— ~ 700.000
56 Ag H

E.coli intestinaux

E.coli extra-intestinaux

STEC



ETEC
EPEC
EHEC
EIEC
EAggEC
DAEC

Toxines LT, ST
eae, bfp
eae, VT
Invasion
afa, LT
afa

Infections urinaires
UPEC

hly
pap
sfa
fimbriae type 1

Méningites néonatales

K1,
O1, O7, O16, O18

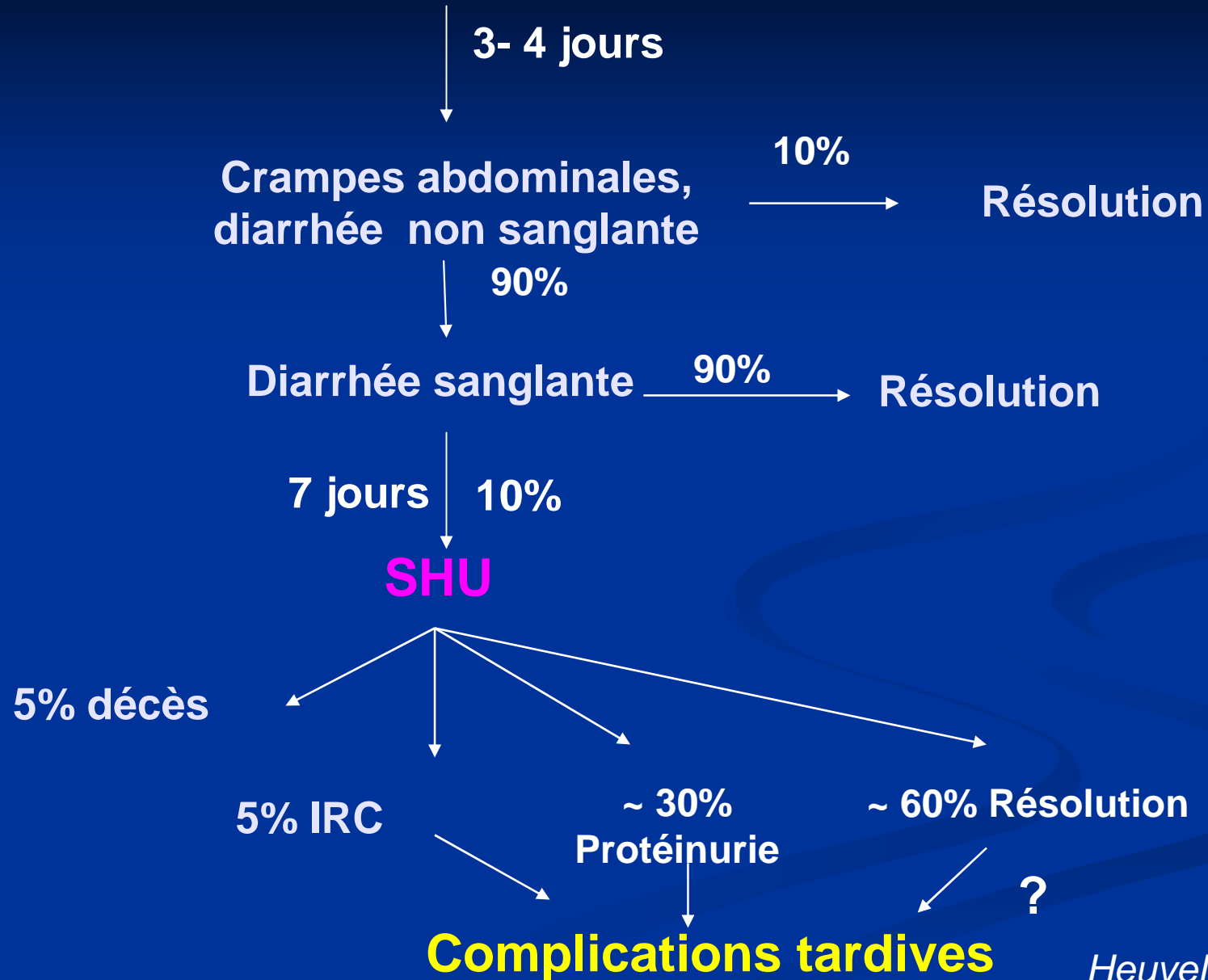
Infections à *E. coli* producteurs de Shigatoxines

- Première description : 1982
Epidémie de colites hémorragiques (USA) *Riley et al. N Engl J Med, 1983*
- 1983: SHU typique et *E. coli* O157 *Karmali et al. Lancet, 1983*
- Cas sporadiques et d'épidémies de diarrhées souvent sanglantes
- Formes cliniques variées :
 - Diarrhée parfois sanglante
 - Colite hémorragique
 - SHU → principale cause IRA chez l'enfant < 3 ans
 - Complications neurologiques et séquelles rénales
 - Létalité : 1 à 6 %
- Potentiel épidémique
- Préoccupation de santé publique dans les pays industrialisés





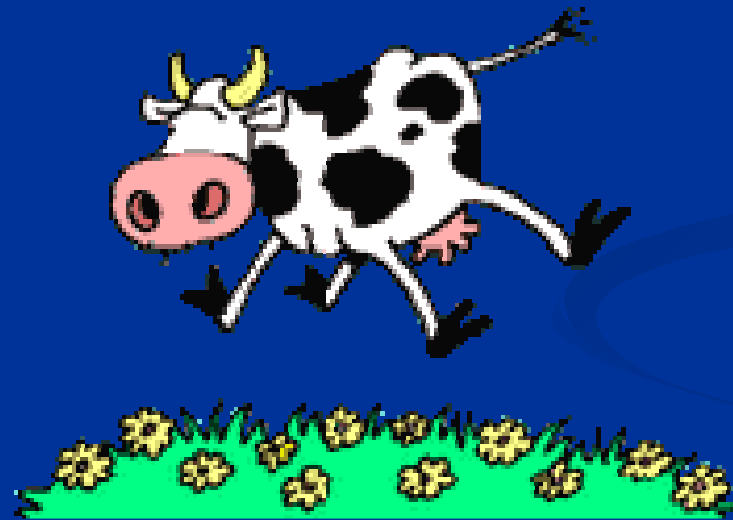
Ingestion de EHEC



Heuvelink, 2000



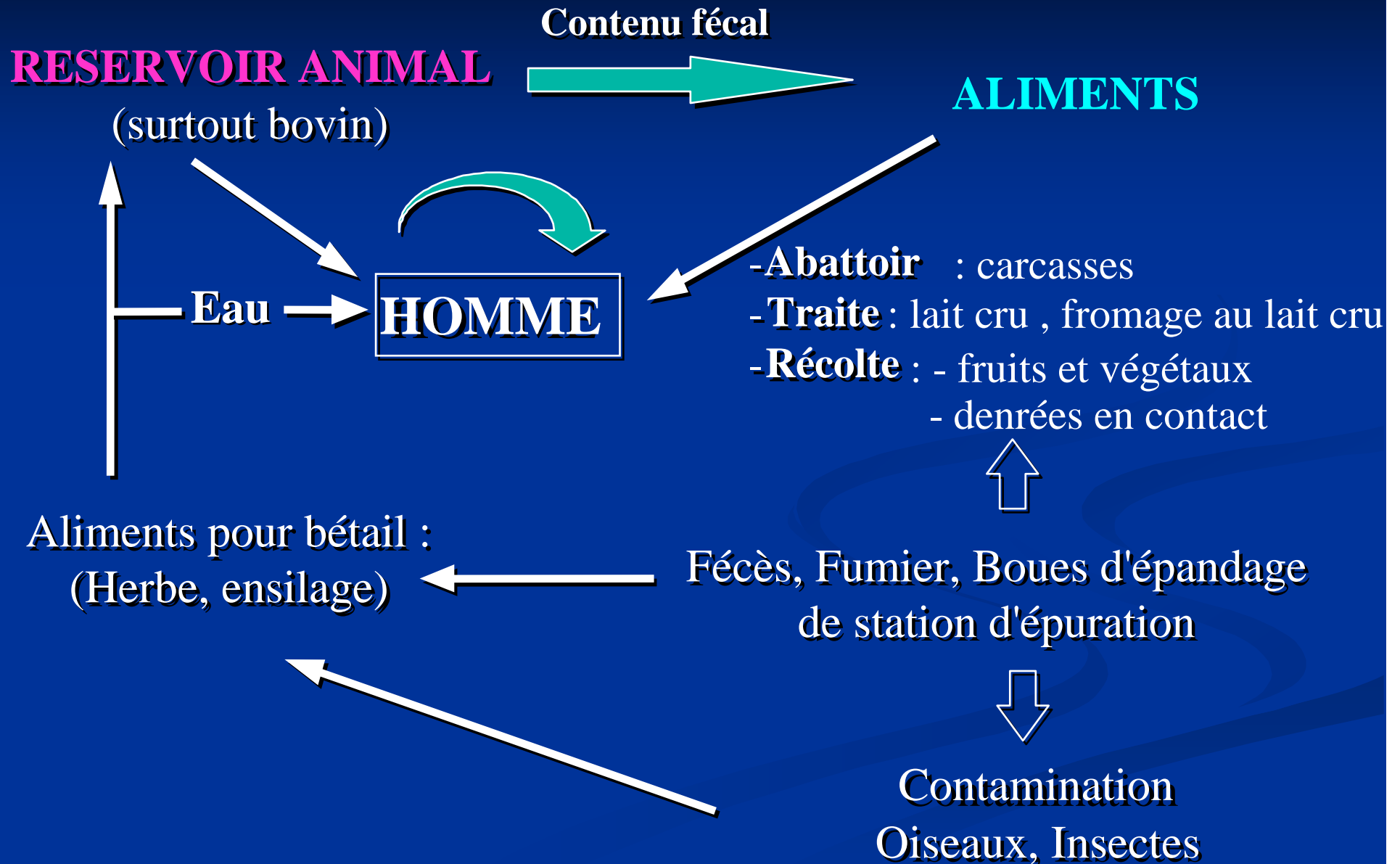
SOURCE/RESERVOIR



Portage sain



CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE



Modes de transmission (1)

- Ingestion d'aliments contaminés (66%) :
 - Denrées d'origine animale (bovins)
 - Végétaux crus
 - Jus de fruits non pasteurisés



Modes de transmission (2)

- Transmission de personne à personne (20%) :
 - Crèches, hôpitaux...
- Ingestion d'eau contaminée (12%) :
 - Eau de boisson
 - Eau de baignade: pataugeoires, lacs...



Modes de transmission (3)

- Contact direct avec les animaux d'élevage ou leur environnement (2%)
 - Visites à la ferme
 - camping
 - foires agricoles...





Ecosse

1996, 400 cas,
18 décès

France : 2005



Etats-Unis

1982-2002

350 épidémies
8598 cas:
- 17% hospitalisations
- 4% SHU
- 0.5% décès



CV1

Japon

1996,
9000 cas,
100 SHU,
9 décès



Diapositive 11

CV1

Christine Vernozy; 06/01/2005



Ecosse

1996, 400 cas,
18 décès

France : 2005, 2011*



Etats-Unis

1982-2002

350 épidémies
8598 cas:
- 17% hospitalisation
- 4% SHU
- 0.5% décès

Allemagne 2011 *

Japon

1996,
9000 cas,
100 SHU,
9 décès



Allemagne 2011
4320 infections
852 SHU
82 décès



France, Bègles 2011
24 infections
7 SHU
5 DGS
12 diarrhées simples

Diapositive 12

CV3

Christine Vernozy; 06/01/2005



ACCIDENTS ALIMENTAIRES ET ALIMENTS RESPONSABLES

Prédominance du sérotype O157:H7

Autres sérotypes : > 400 sérotypes décrits
O26, O111, O103, O145, O121 → 60% des STEC non O157

DOSES INFECTIEUSES

TRES BASSES

QUELQUES BACTERIES /25 g

Multiplication bactérienne non nécessaire
(une simple contamination est suffisante)

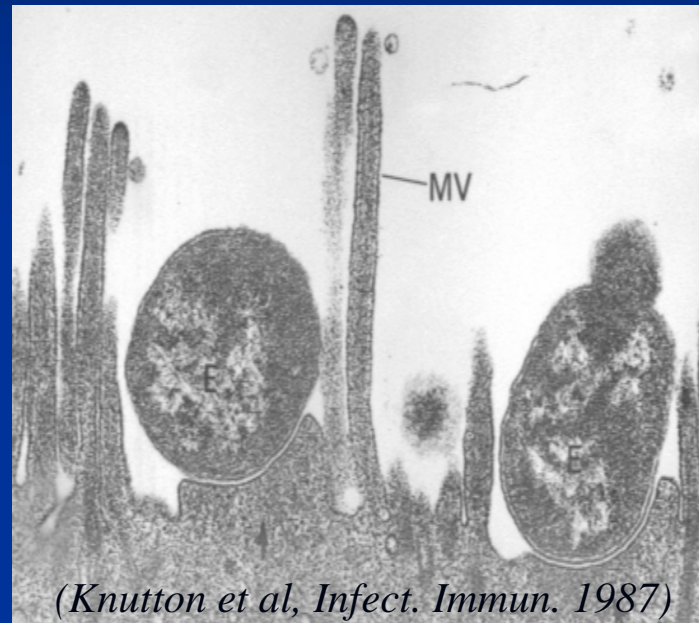
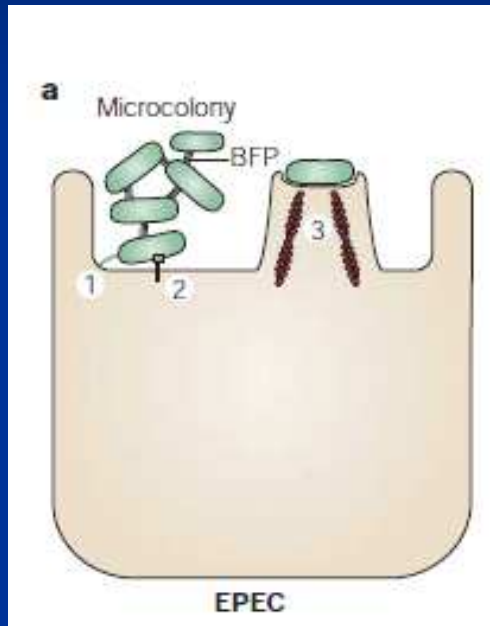
FACTEURS DE VIRULENCE

- Adhésion à la muqueuse digestive
- Production de verotoxines ou Shigatoxines
- Autres facteurs de pathogénicité



EPEC

Lésions d'attachement et d'effacement

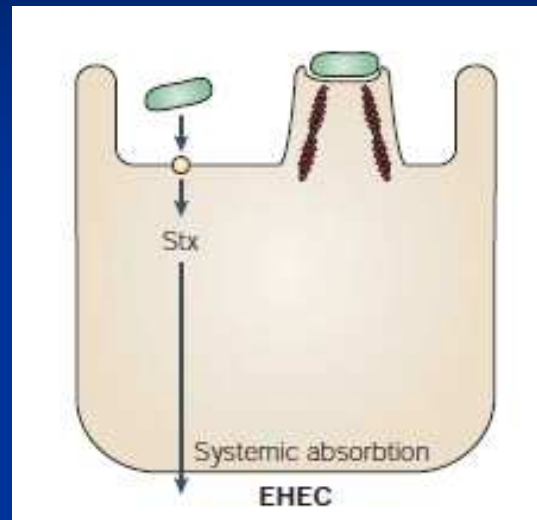


- Au niveau du colon et du caecum
- Effacement et / ou destruction des microvillosités de l'épithélium intestinal
- Condensation de l'actine cellulaire → pedestal
- Adhésion étroite par l'intermédiaire de l'intimine, produit du gène *eae*



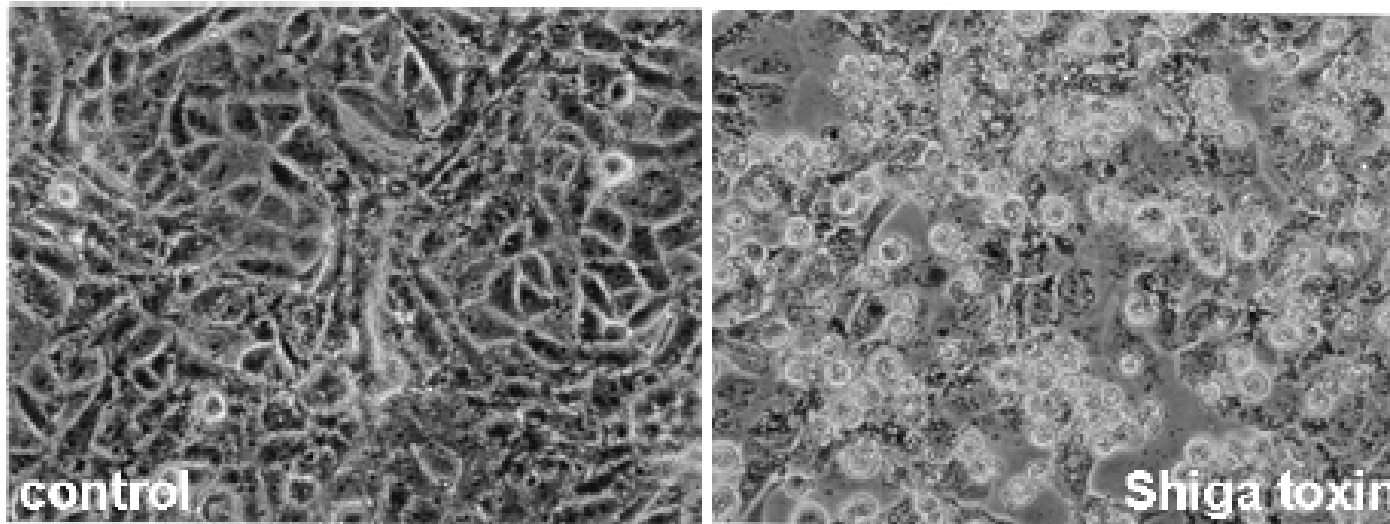
EHEC OU STEC

Verotoxines ou Shiga like toxines



- Exotoxines protéiques : deux types (stx1/ stx2)
- Effet cytopathogène sur cellules Vero, HeLa
- Synthèse codée par des phages
- Récepteurs Gb3 (cellules intestinales , endothelium vasculaire)
 - > mort cellulaire par arrêt de la synthèse protéique

Effet cytopathogène



Gold standard: Verocelltest



Verotoxines ou Shiga like toxines

Ancienne dénomination	Nouvelle dénomination	
	gène	protéine
Toxine de Shiga	<i>stx</i>	Stx
Toxine Shiga-like de type I ou (SLT-I) ou vérotoxine 1 (VT1)	<i>stx₁</i>	Stx1
SLT-II ou VT2	<i>stx₂</i>	Stx2
SLT-IIc/d ou VT2c/d	<i>stx_{2c/d}</i>	Stx2c/d
SLT-II/f ou VT2e/f/g	<i>stx_{2e/f/g}</i>	Stx2e/f/g

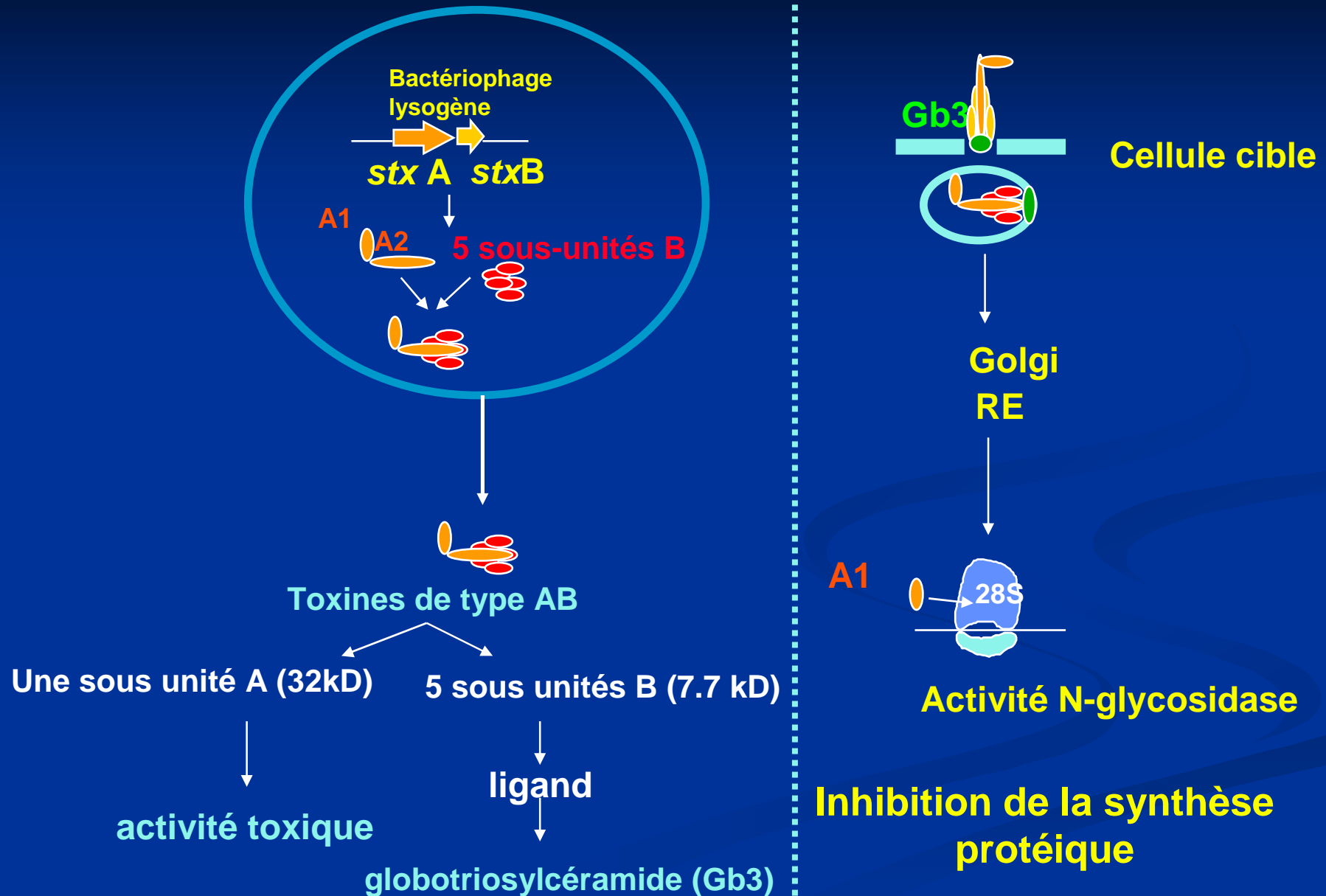
99 % d'homologie (between Stx and Stx1)

55 % d'homologie (between Stx and Stx2)

90% d'homologie (between Stx2c/d and Stx2e/f/g)



Verotoxines ou Shigatoxines





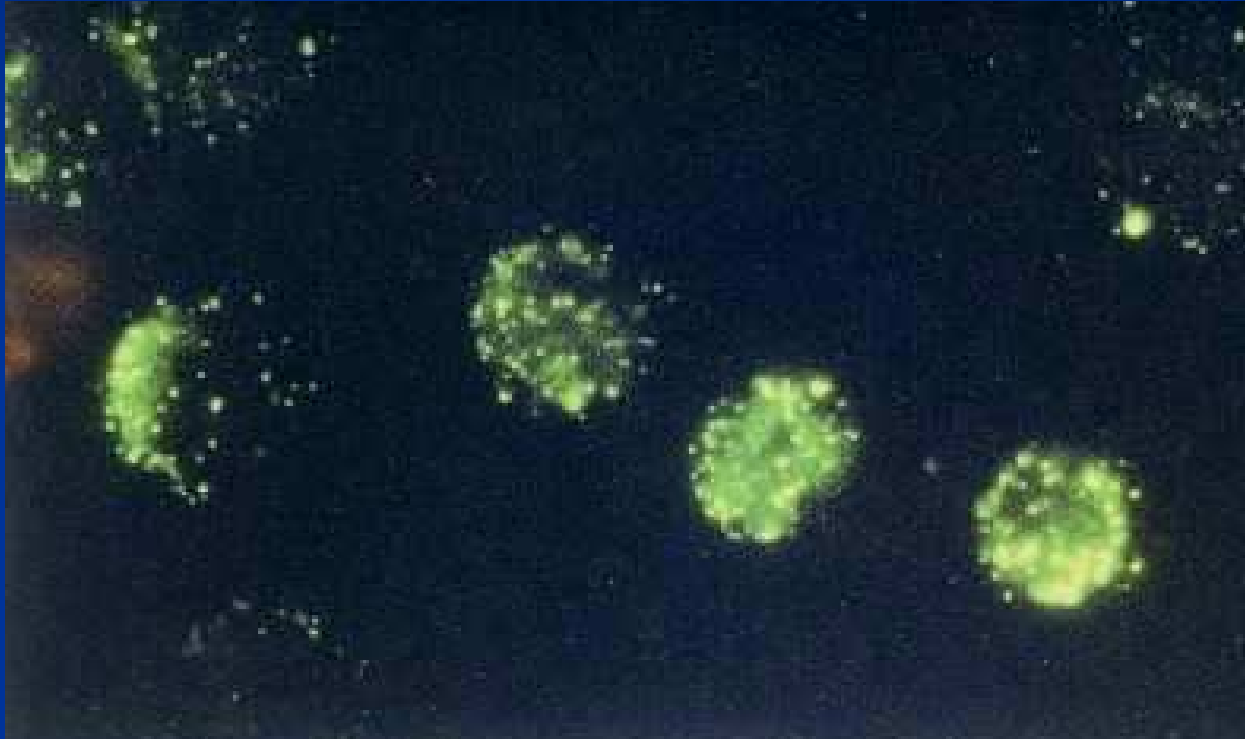
Récepteurs glycolipidiques

Globotriosylcéramide (Gb3)

- à la surface des entérocytes, capillaires du TD
- sur les cellules endothéliales du rein humain
 - dans les glomérules des enfants < 2 ans
 - masqués chez l'adulte
- sur les cellules endothéliales du pancréas et du SNC

Lingwood, Nephron, 1994

- Multiplication des EHEC au niveau du colon sans invasion
- Synthèse de Shiga toxines diffusant dans tout l'organisme



Maroeska, Kidney Int 2001



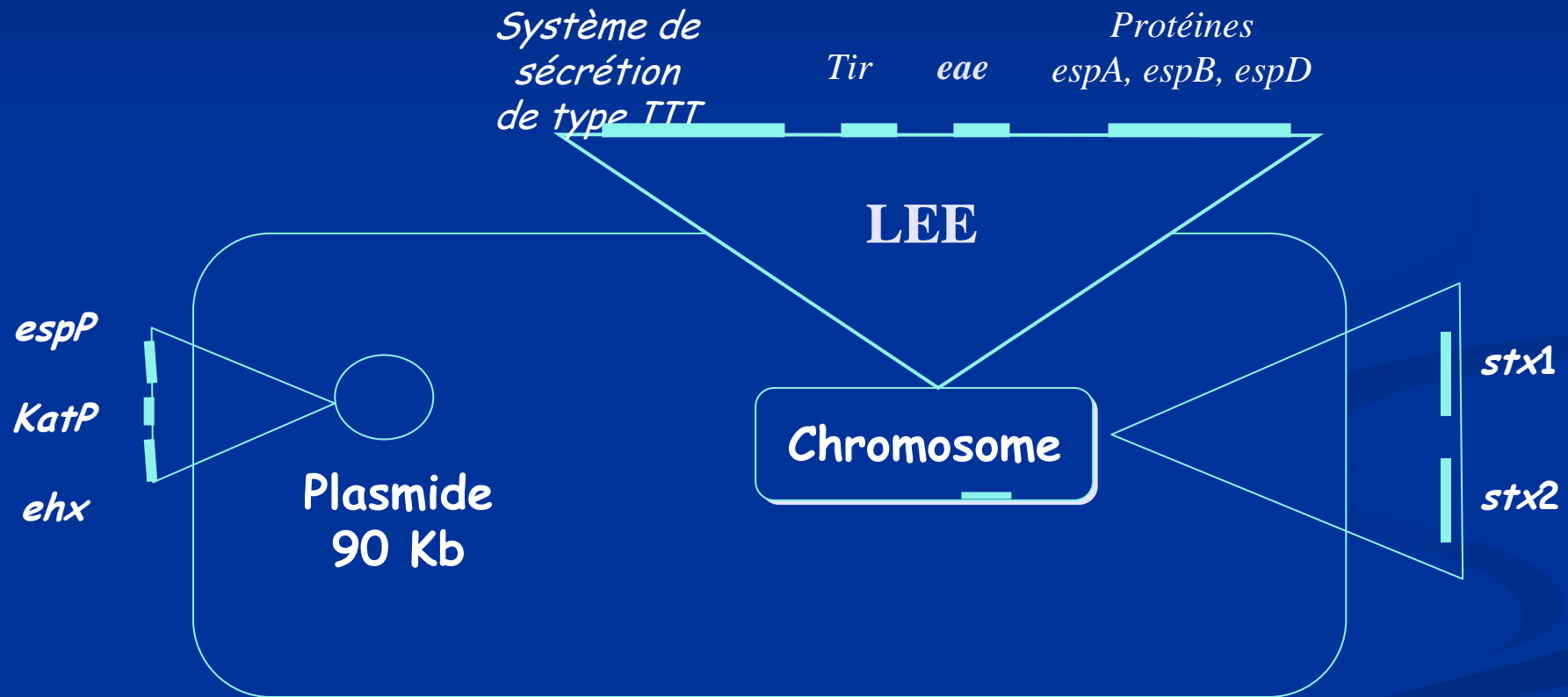
AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE

- Hémolysine gène *ehxA*
- Résistance à l'acidité gastrique : gène *rpoS* codant pour un facteur permettant la survie du germe à un pH <2,5
- Serine protéase (*EspP*) plasmidique : clivage du facteur V
- Enterotoxine thermostable *EAST1*: diarrhée aqueuse
- Catalase (*KatP*) plasmidique : burst oxydatif des PNN et des macrophages
- *saa* :STEC agglutinating adhesin (STEC LEE -)

Law, J Applied Microb, 2000



Gènes codant les facteurs de virulence



Syndrome Hémolytique et Urémique

SHU défini par la triade

anémie hémolytique (Hb < 10 g/dl) + schizocytes

thrombopénie (< 150 000/mm³)

insuffisance rénale aiguë



SHU D+

90-95 % des SHU

dû à une infection à *E.coli* producteurs de Shiga toxine



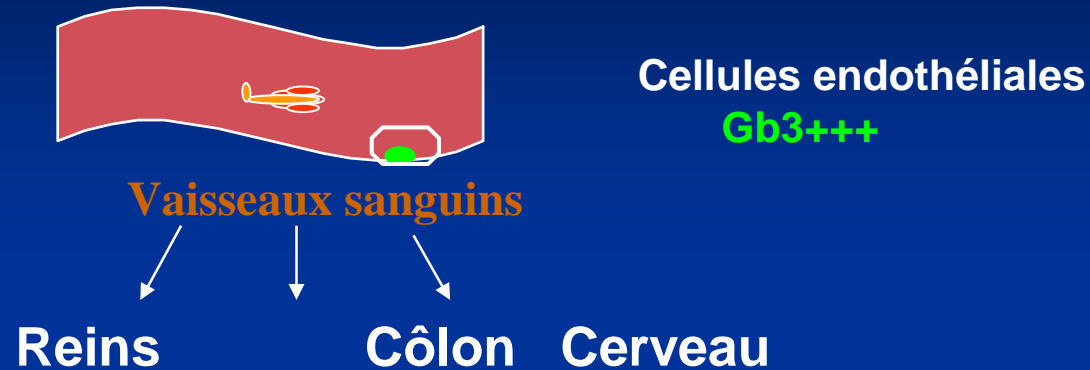
SYNDROME HEMOLYTIQUE ET UREMIQUE CHEZ L'ENFANT

3 types

- **SHU typiques post-diarrhée** : 90-95 % des cas
 - Association à une infection à *E. coli* producteurs de vérotoxines (ou Shiga toxines), principalement du sérotype 0157:H7, retrouvée dans ≈ 85 % des cas
 - Prodromes digestifs : diarrhée \pm méléna
 - première cause d'insuffisance rénale aigue du nourrisson
- **SHU atypiques** : ≈ 5 % des cas

Souvent familial, de transmission dominante autosomique ou plus souvent récessive autosomique ; parfois associés à un taux bas de C_3 , isolé ou associé à un déficit en facteur H ; certains cas à début néonatal associés à un déficit en protéase du facteur von Willebrand
- **SHU secondaires**
 - greffe de moelle
 - post infectieux : pneumocoque, certains virus
 - maladies métaboliques

Rôle des Shiga-toxines dans la physiopathologie (1)



Cibles = cellules endothéliales vasculaires

=> Mort des cellules

=> agglutination des plaquettes à la paroi vasculaire

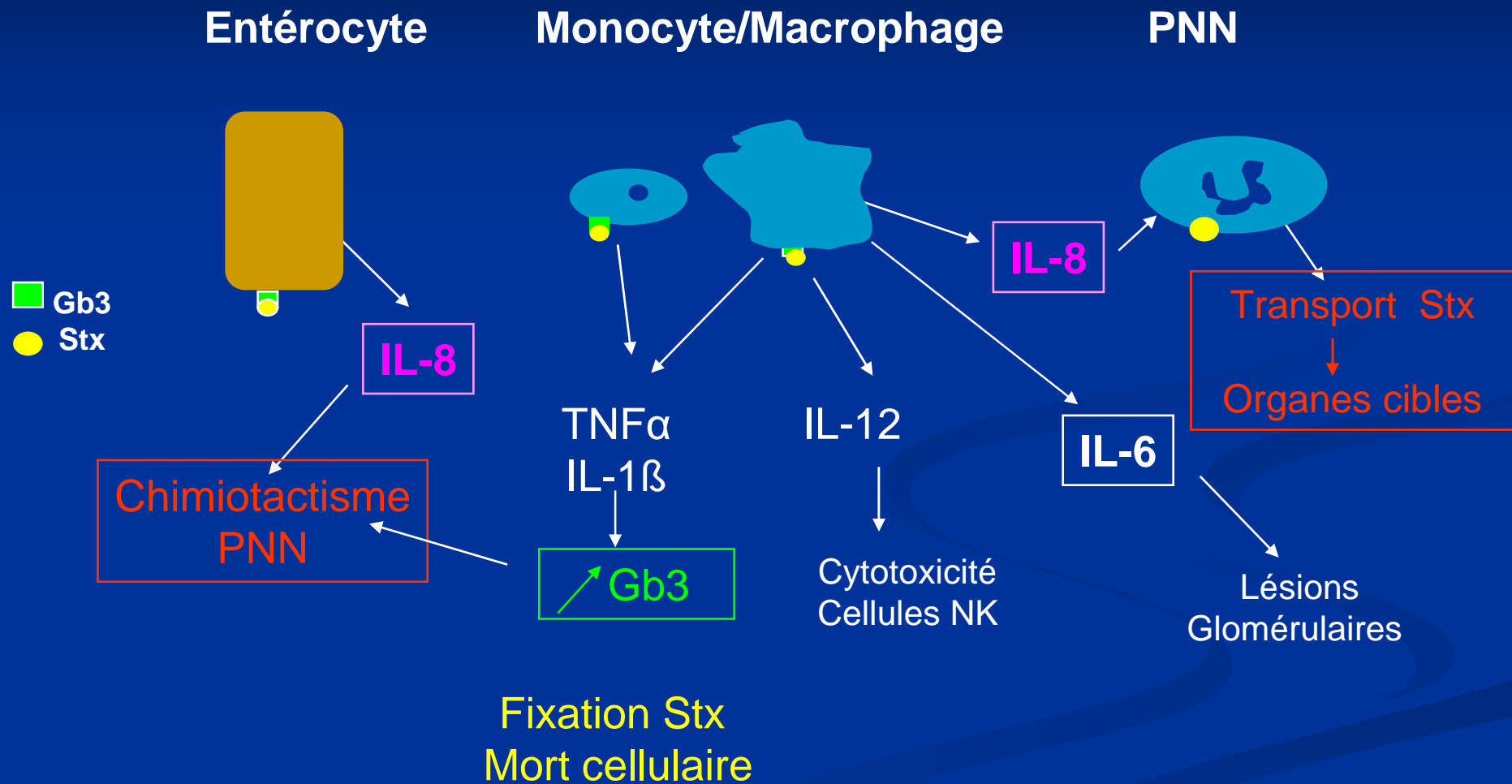
=> développement de thrombi

=> thrombopénie périphérique de consommation

=> hémolyse intravasculaire mécanique = schizocytes

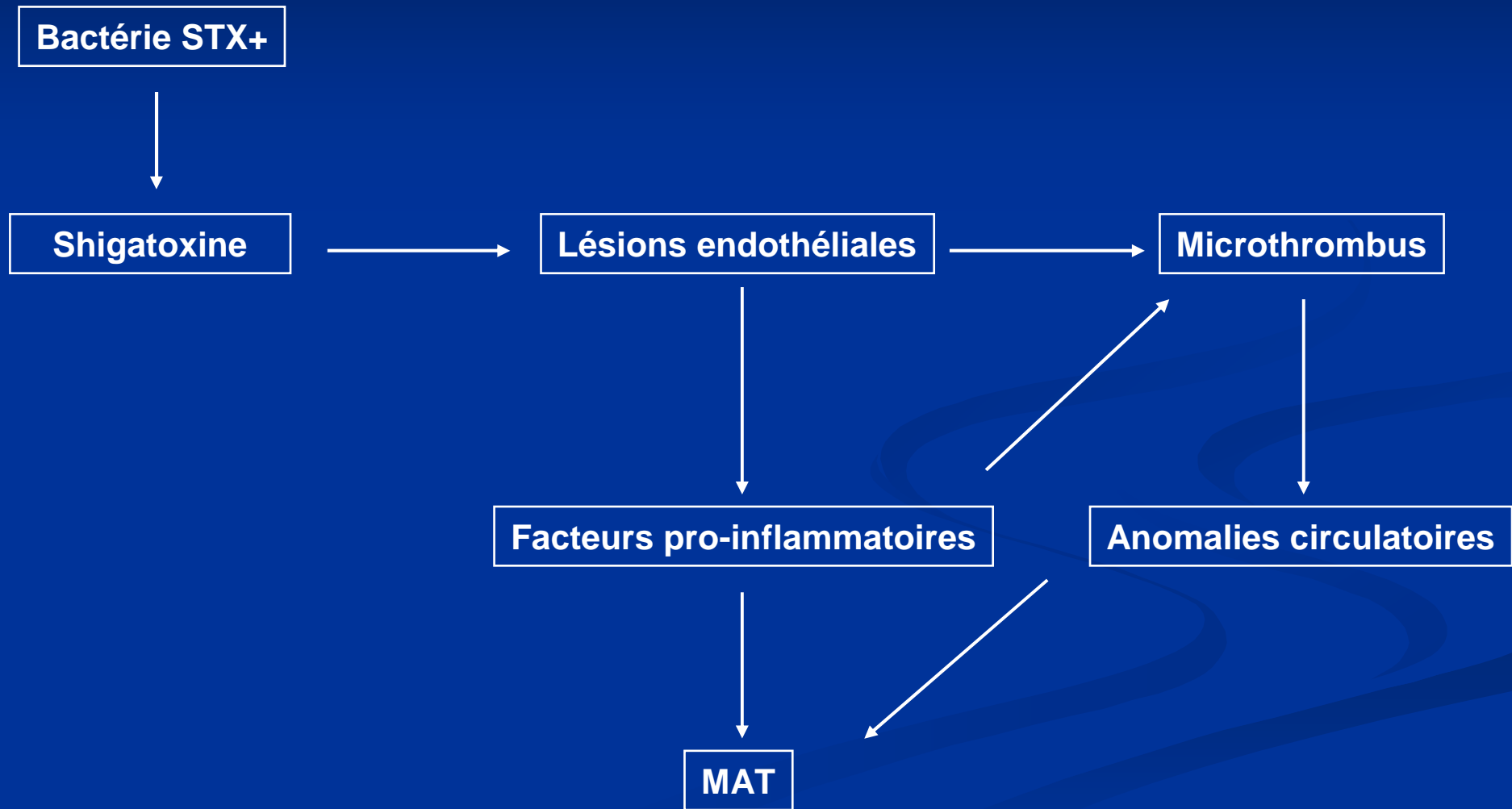
Rôle des Shiga-toxines dans la physiopathologie (2)

Induction de cytokines





Physiopathologie





SHU

Caractéristiques cliniques à la phase aiguë

www.invs.sante.fr; Gerber 2002 ; Loirat 2004 ; Noris 2005 ; Lynn 2005

Diarrhée prodromique sanglante	90-95 % 60-70 %
Intervalle entre diarrhée et SHU	5-6 jours (1 à 35 j)
Transfusion à la phase aiguë	≈ 70 %
Dialyse à la phase aiguë	50 %-60 %
Complications neurologiques	≈ 20 %
Complications intestinales/pancréatiques	≈ 10 %
Cardiomyopathie	≈ 2 %
Décès à la phase aiguë	1 %-2 % en France

SHU D+

PRONOSTIC

Garg, JAMA 2003

Métanalyse de 49 études, dans 18 pays
3476 patients de 1 mois à 18 ans
recul moyen 4.4 ans (1 an à 22 ans)

	Moyenne	IC 95 %
Décès ou insuffisance rénale terminale	12 %	10-15 %
Insuffisance rénale chronique, hypertension artérielle ou protéinurie	25 %	20-30 %

Diagnostic bactériologique des infections à STEC

Recueil des selles
STEC : portage bref

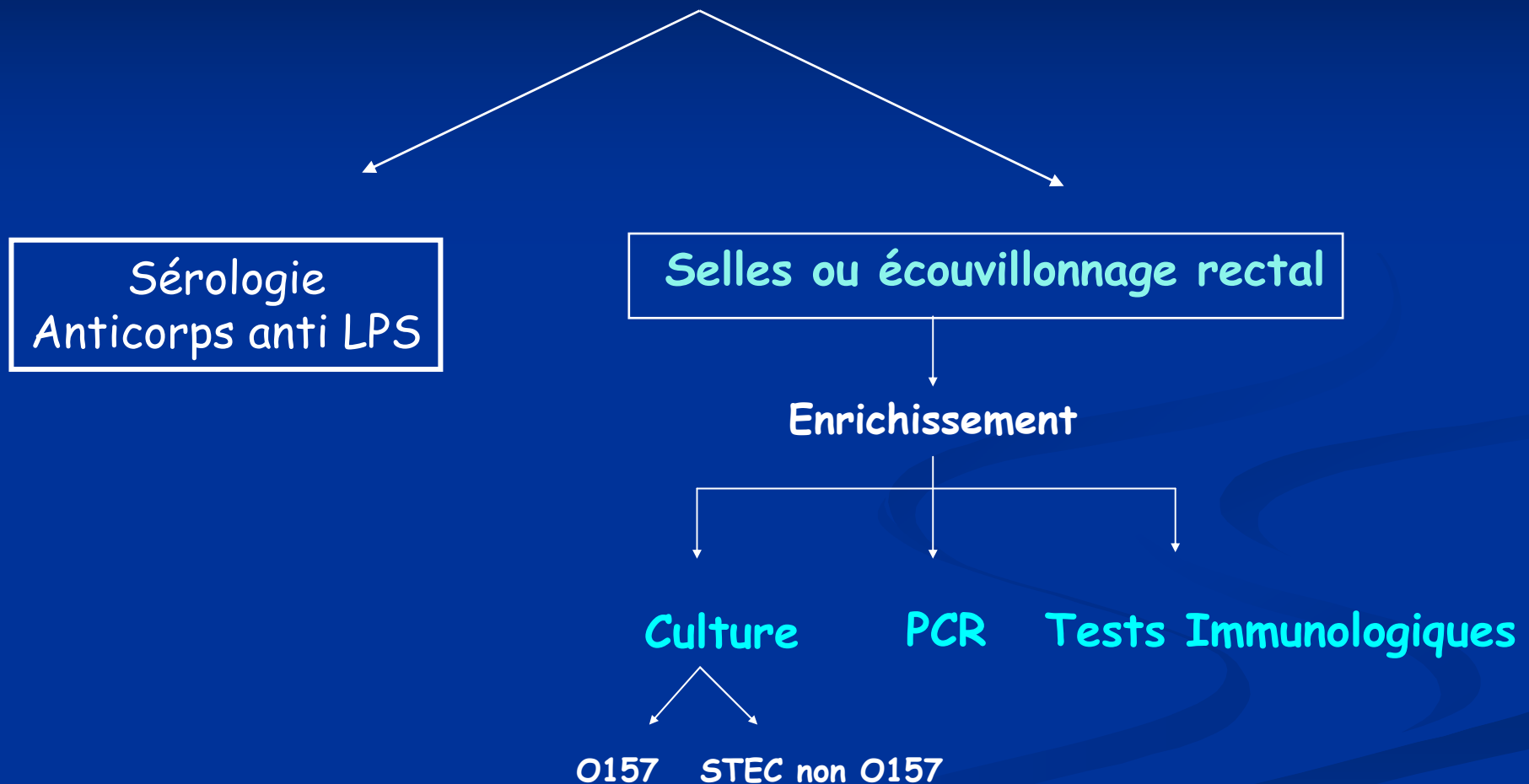


4 à 7 jours maximum
après le début des symptômes

Tarr, CID, 1995



Diagnostic bactériologique des infections à STEC





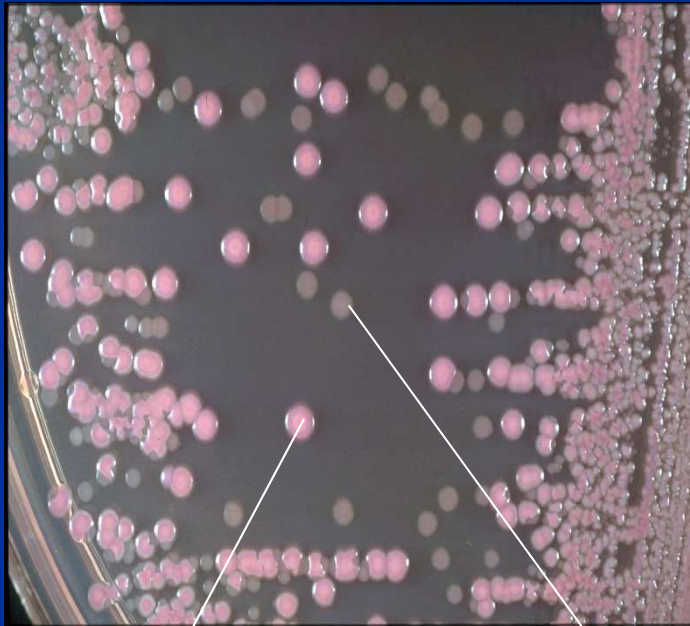
E.coli O157 : H7

- ◆ Utilisation des caractéristiques biochimiques de *E. coli* O157:H7 (*Mutants!*)
 - ◆ sorbitol –
 - ◆ β -glucuronidase –
 - ◆ Résistance intermédiaire au céfixime et au tellurite



Quels milieux ?

SMAC



E.coli

E.coli O157
Sorbitol -

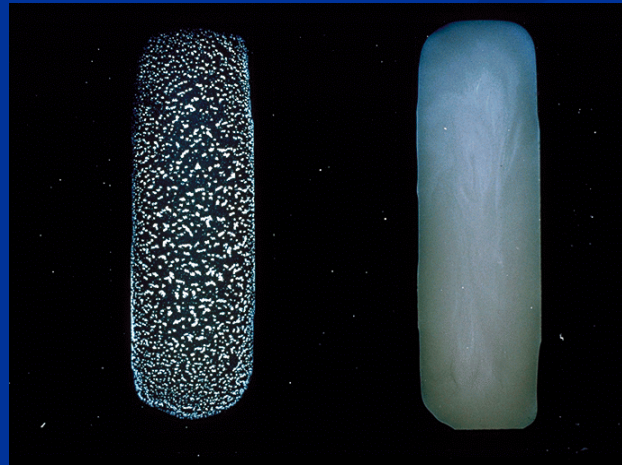
SMAC-CT



Tests de confirmation

Sur colonies suspectes

- antigène somatique O157 (agglutination latex)
- identification de l'espèce *E. coli*
- Recherche des gènes de virulence





METHODES DE DETECTION DES STEC non O157

**AUCUNE CARACTERISTIQUE
BIOCHIMIQUE COMMUNE !!!!!**



METHODES DE DETECTION DES STEC non O157

Isolement

- Drigalski, milieux chromogènes
- Gélose au sang - enterohemolysin agar
- Agglutination des sérotypes fréquents:
O111, O26, O103, O145, O121



Mise en évidence des gènes de virulence

Méthodes immunologiques

- Détection Stx et/ou Ag 0157
- Immuno chromatographie, ELISA...

- Avantages :
 - Faciles à mettre en œuvre
 - Alerte pour le clinicien

- Inconvénients
 - Moins sensibles
 - Lecture parfois difficile
 - Réactions croisées (norovirus, Pseudomonas..)

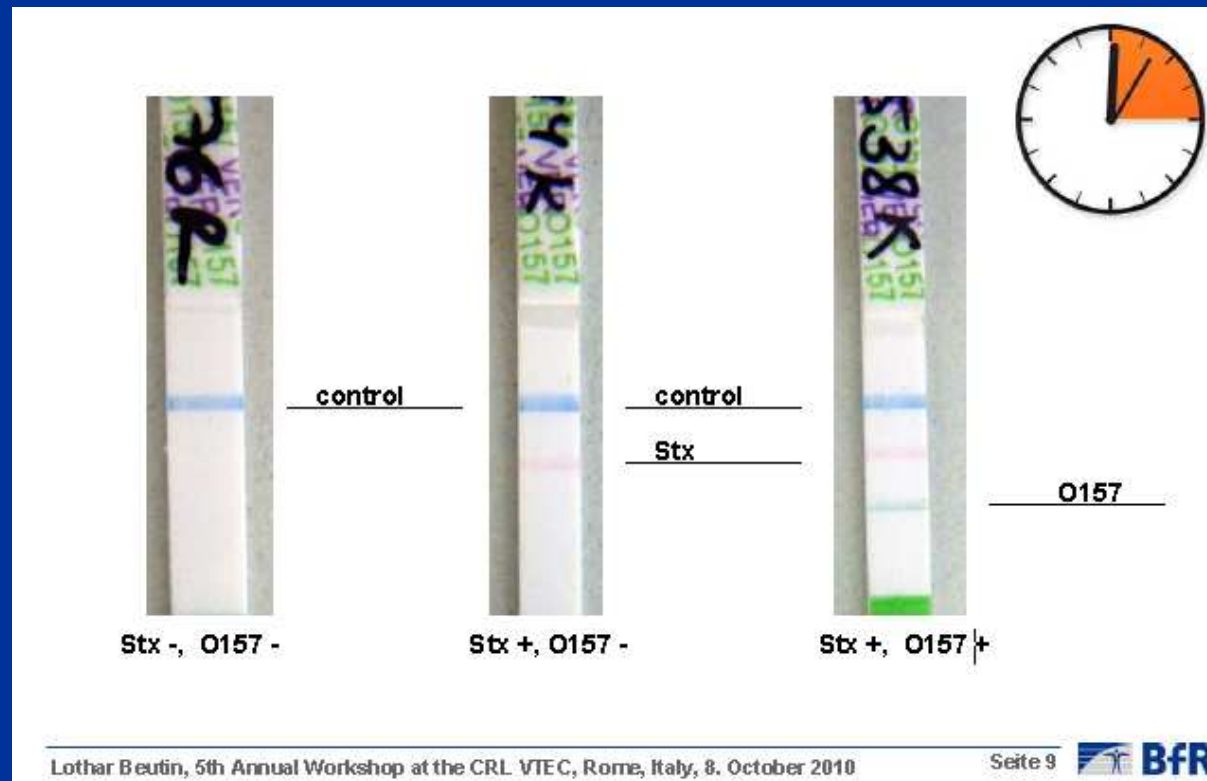
Tests immunologiques Stx EIAs

- Premier EHEC
- ProSpecT Shiga Toxin
- Duopath Verotoxin GLISA
- ImmunoCard STAT! EHEC
- BioStar OIA SHIGATOX



Test immunochromatographique

- Détection des toxines et Ag O157
- Nécessite un enrichissement en bouillon et l'induction de la production de Stx par la mitomycine C





PCR

Mise en évidence des gènes de virulence

- Directement dans les selles après enrichissement (4 à 6h en eau peptonée)
- Sur une primoculture de la selle
- Sur les colonies suspectes

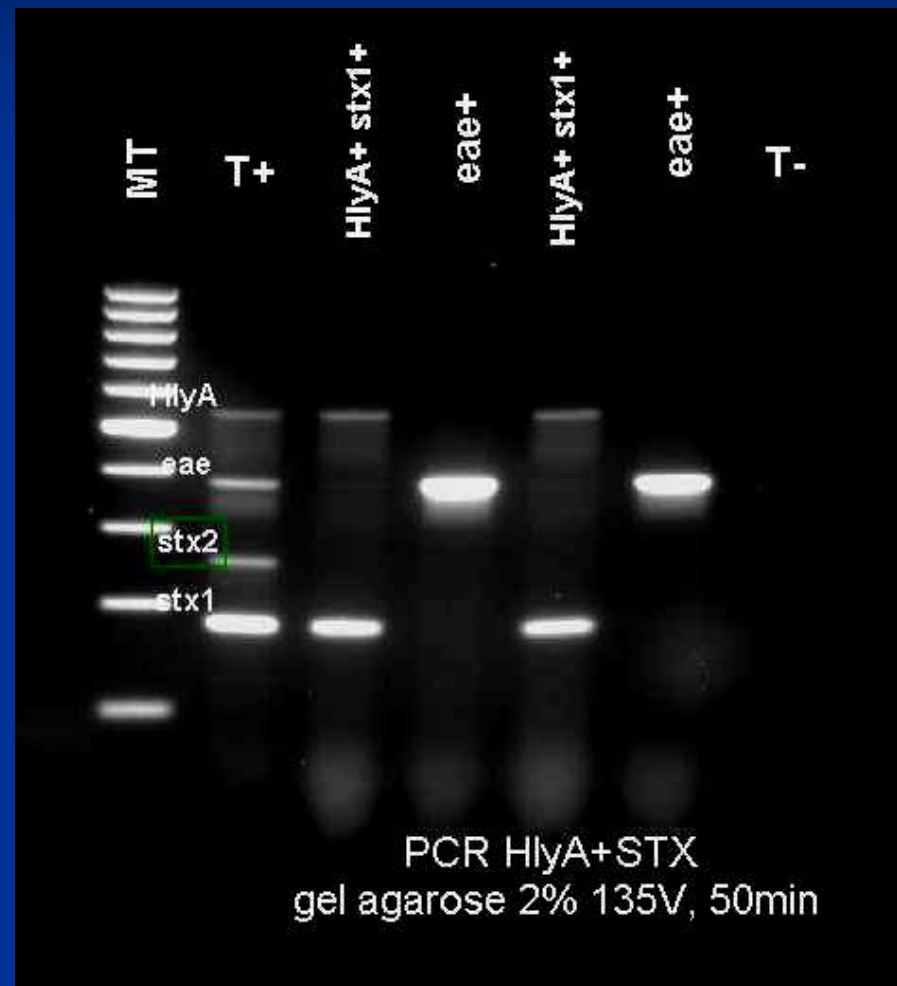


PCR conventionnelle
Temps réel



PCR MULTIPLEX

Sur les selles de patients atteints de SHU

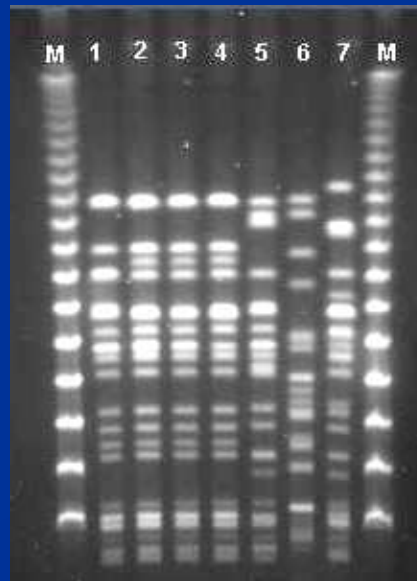


Présence de Shiga toxine

Isolement de la bactérie indispensable



Etudes épidémiologiques moléculaires
(Pulsotypie, Rep PCR)





Diagnostic sérologique des infections à STEC

Sérum précoce et sérum tardif

- Mise en évidence des **anticorps anti LPS** de 8 serogroupes d'*E.coli* dont O157 : H7
- Ac de classe IgA, IgM, et IgG
- Techniques : ELISA, immunoblotting, hémagglutination
- Indispensable
 - pour les études épidémiologiques lorsque la mise en évidence des STEC dans les selles est négative ou impossible
 - l'identification des autres serogroupes STEC



CDC Recommendations for Laboratory Diagnosis of STEC

MMWR[™]
Morbidity and Mortality Weekly Report

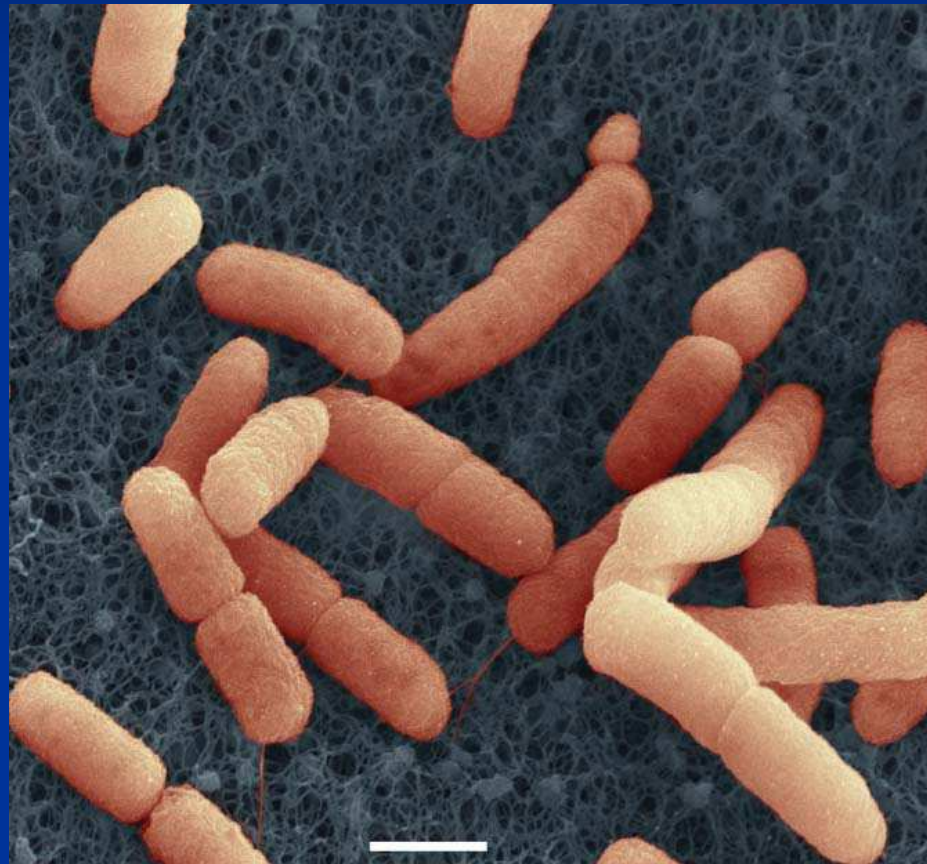
BOX. Recommendations for laboratory identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)

- Health-care providers should notify clinical diagnostic laboratories when STEC O157 infection is suspected (e.g., because of bloody diarrhea or hemolytic uremic syndrome) so that appropriate testing methods can be applied.
- Clinical diagnostic laboratories should strongly consider including STEC O157 in their routine bacterial enteric panel (with *Salmonella*, *Shigella*, and *Campylobacter*).
- The best way to identify all STEC infections is to screen all stool samples submitted for routine enteric bacterial testing for Shiga toxins (Stxs) using enzyme immunoassay (EIA) or polymerase chain reaction. Ideally, the clinical diagnostic laboratory should culture simultaneously for STEC O157 (e.g., on sorbitol MacConkey agar). Simultaneous culture facilitates rapid diagnosis and treatment of patients with STEC O157 infection and rapid subtyping by public health laboratories; such rapid action is most important when the index of clinical suspicion for STEC O157 is high.
- Clinical diagnostic laboratories that use an Stx EIA but do not perform simultaneous culture for STEC O157 should culture all Stx-positive broths for STEC O157 as soon as possible and rapidly forward these isolates to a state or local public health laboratory for confirmation and subtyping.
- When an Stx-positive broth does not yield STEC O157, the broth culture should be quickly forwarded to the state or local public health laboratory for identification of non-O157 STEC.
- State and local public health laboratories should confirm the presence of Stx in broths sent from clinical laboratories and should attempt to obtain an STEC isolate. All non-O157 STEC isolates should be sent by public health laboratories to CDC for confirmation and further characterization.



Epidémie atypique en 2011

E.coli O104 H4



EHEC bacteria of the outbreak strain O104:H4
Scanning electron microscope. Scale: 1 μ m
Source: Holland, Laue (Robert Koch Institute)



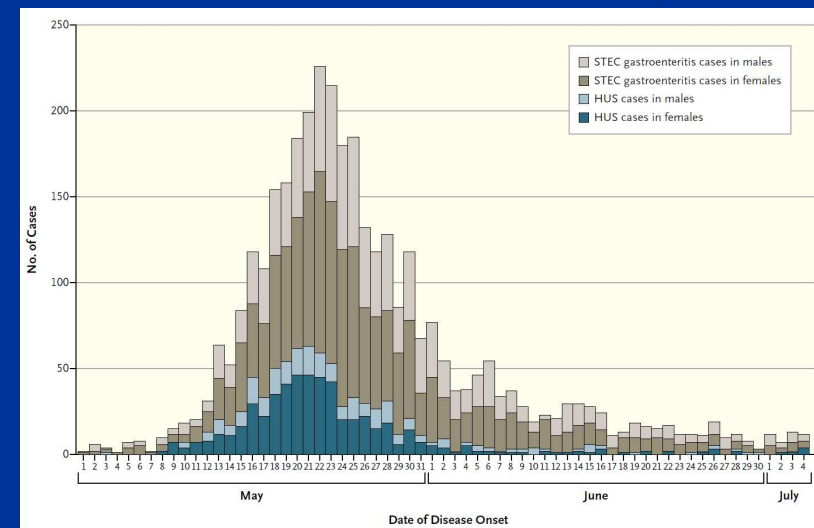
Epidémie atypique en Allemagne Mai – Juin 2011

4320 infections

852 SHU (90% chez des Adultes)

82 décès

- Personnes atteintes
 - majoritairement adultes
 - 2/3 de femmes : régime alimentaire
- Incubation moyenne : 8 jours vs 3-4 jours pour les EHEC
- Virulence inhabituelle : 1/4 des formes évoluant vers des formes graves vs 1/10 habituellement
- Véhicule alimentaire ?



Frank, NEJM, 2011



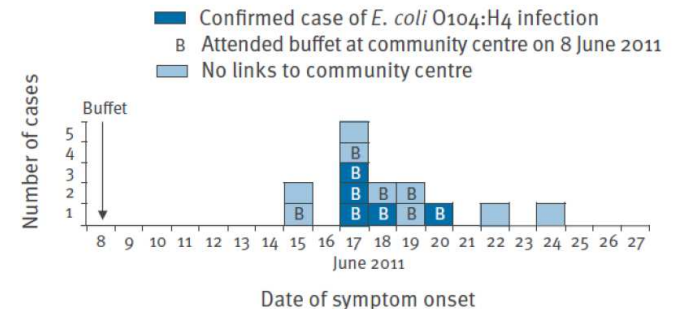
Bègles, France, 2011

- 8 juin 2011 : Buffet centre de loisirs (169 participants)
- 1^{er} cas : 15/06/2011
- 24 infections : 22 adultes dont 18 femmes

- 7 SHU
- 5 DGS
- 12 diarrhées simples

- Incubation moyenne : 9 jours
- Aucun voyage en Allemagne
- Véhicule alimentaire ?

Gault et al.: Eurosurveillance, Volume 16, Issue 26, 30 June 2011
Cases of HUS or bloody diarrhoea due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 with date of symptom onset since 10 June 2011, Gironde, France, June 2011 (n=14)

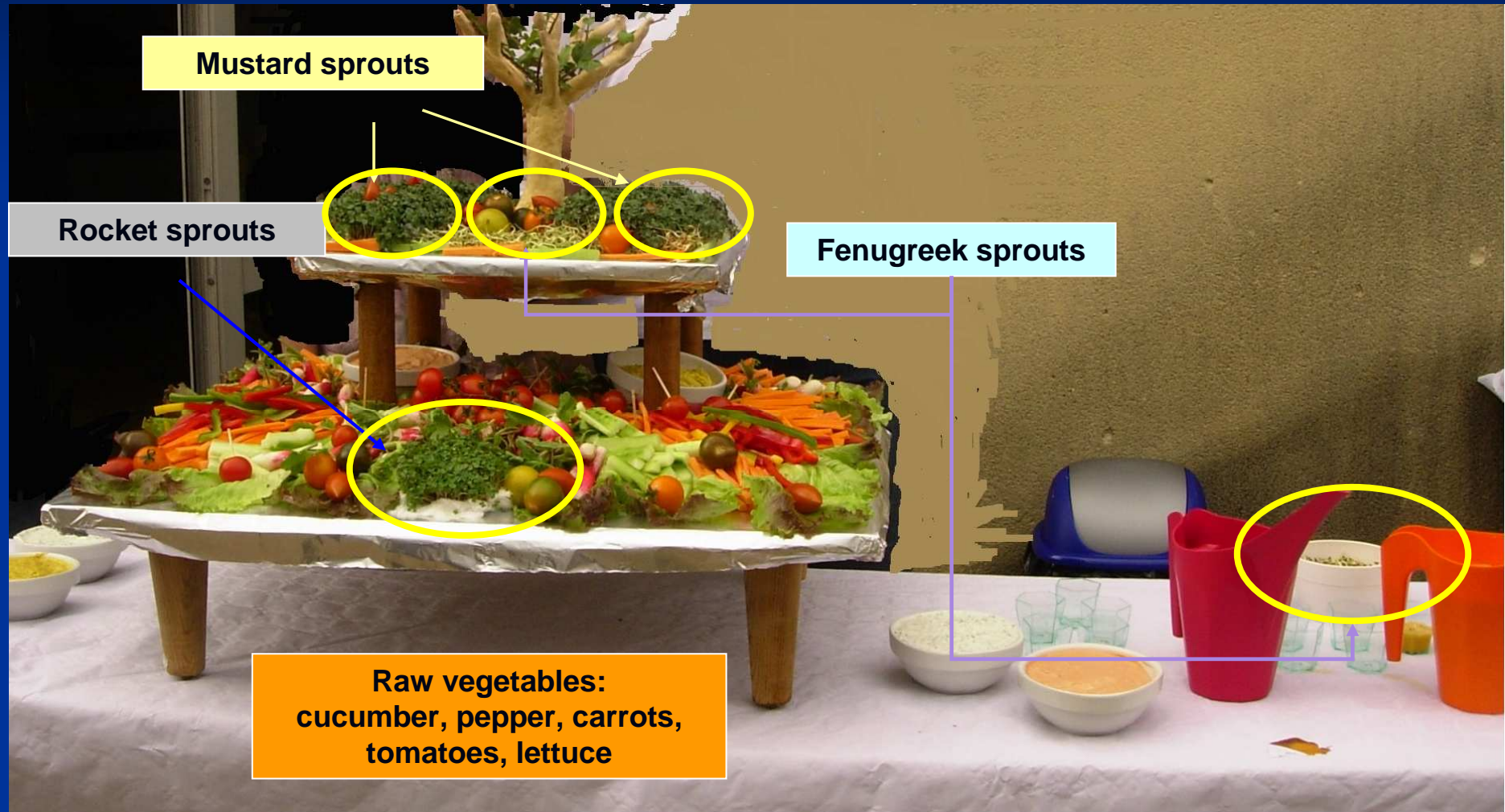


HUS: haemolytic uraemic syndrome.

Of the 15 cases of HUS or bloody diarrhoea, date of symptom onset was unavailable for one case, who attended the buffet on 8 June 2011.



Buffet à Bègles 169 participants



Origine alimentaire

- Interrogatoire des patients (difficile temps d'incubation plus long)
- Implication des graines germées de fenugrek
- 10 tonnes Egypte vers l'Allemagne via Rotterdam
- Rotterdam → 2 tonnes en GB Mise sous sachet de 50 g
- Distribution dans les jardinerie du Sud Ouest



E.coli O104 H4

Allemagne 2011

4320 infections

852 SHU

82 décès

France, Bègles 2011

24 infections

7 SHU

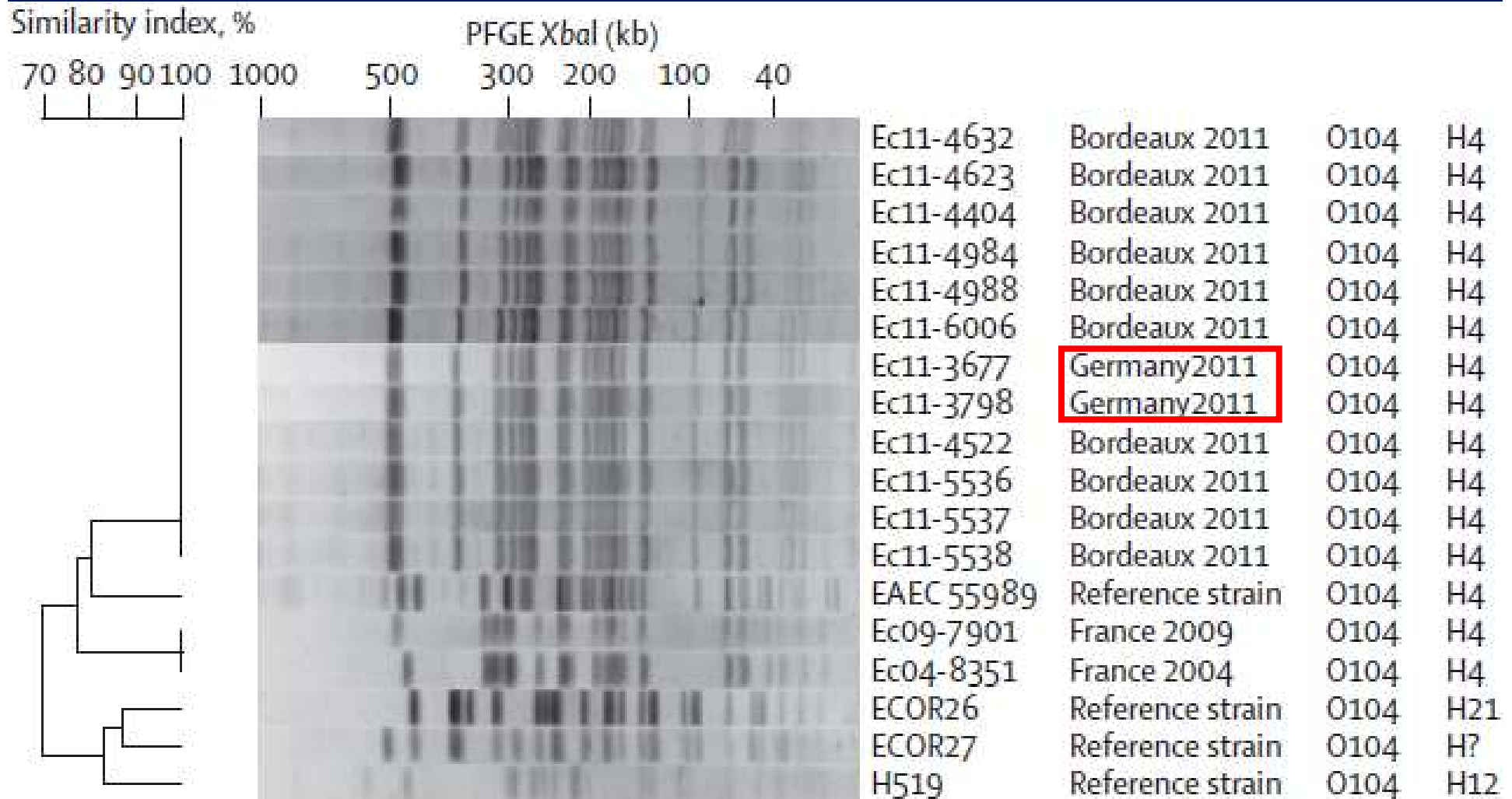
5 DGS

12 diarrhées simples

Clone identique ?



Analyse en champ pulsé



O104 : H4 épidémique

- stx2 +
- eae - → Mécanisme d'adhésion ?
- aggR +

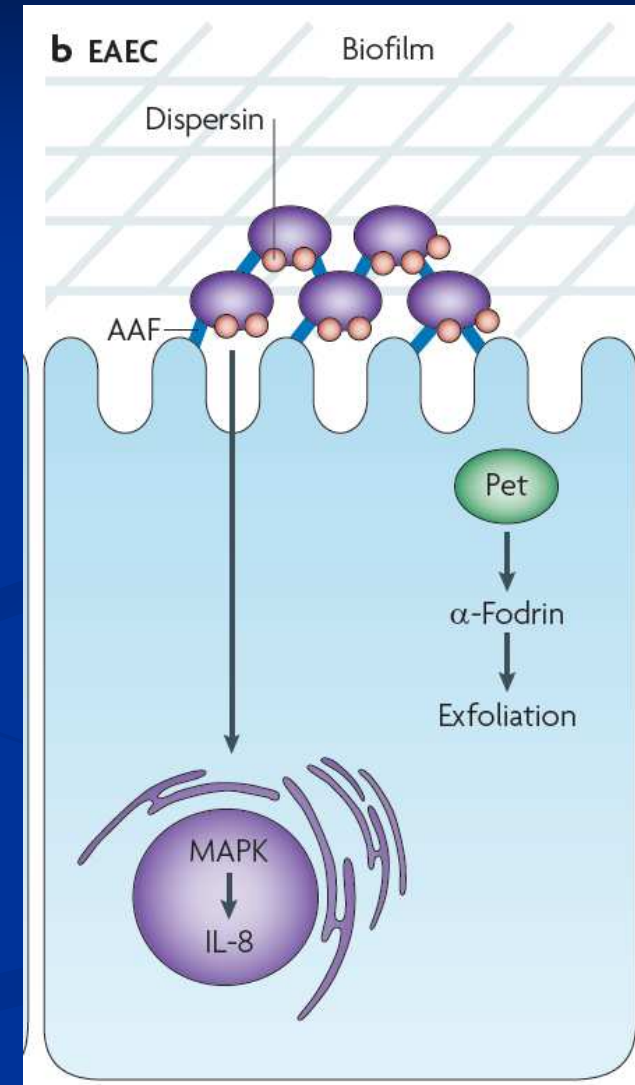
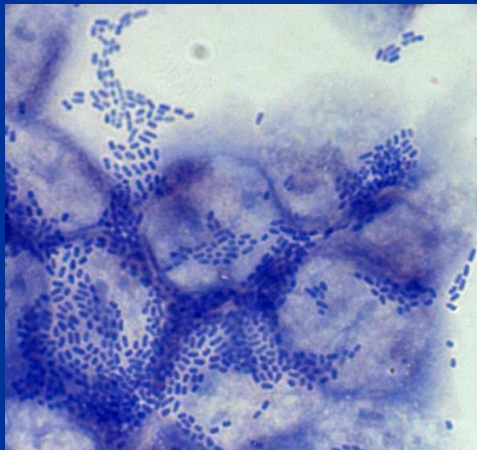


E.coli entero-aggrégant EAggEc

Adhésion aggrégative
en « briques empilées »



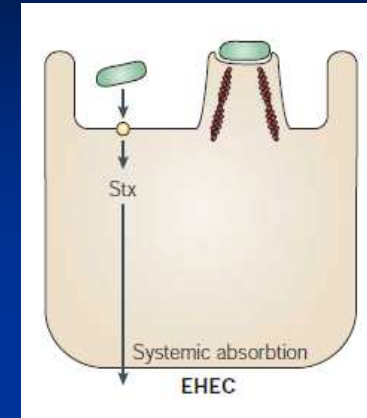
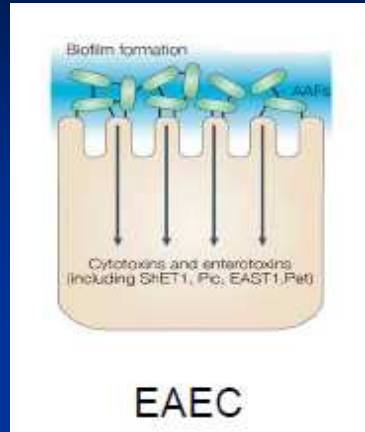
Nécrose du pôle apical des
villosités intestinales avec oédème
inflammatoire et hémorragique de
la sous muqueuse



Croxen and Finlay Nature Review 2010

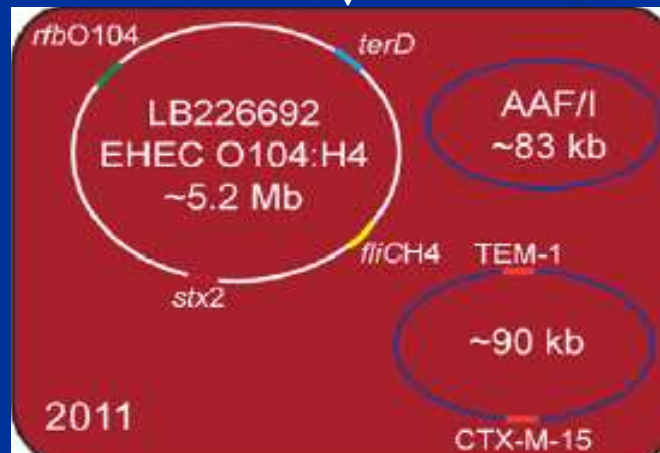


Nouveau pathovar hybride E.coli entero-agregant enterohémorragique (EAHEC)



EXPEC

Groupe B1 - ST678
HPI
Aerobactine



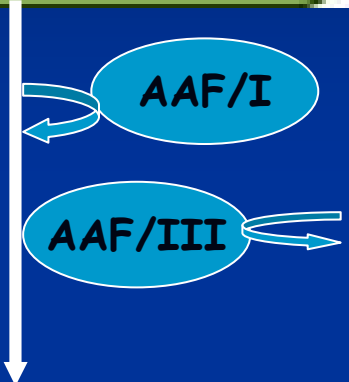
**E.coli O104 H4
épidémique**



3% homologie avec la souche O104 isolée à Bangui (1989) chez un patient VIH.



1989
Souche O104 EAEC
Centrafrique



EAHEC

2011
Allemagne
Souche Epidémique



- Groupe ST678
- Acquisition et perte de facteurs de virulence au cours de l'évolution



Antibiothérapie ?

- Antibiothérapie bactéricide: effets délétères
 - Relargage massif Vérotoxines (STX) suite lyse bactérienne
 - Induction de synthèse de STX

Scheiring et al. Pediatr nephrol. 2008

- Intérêt des macrolides

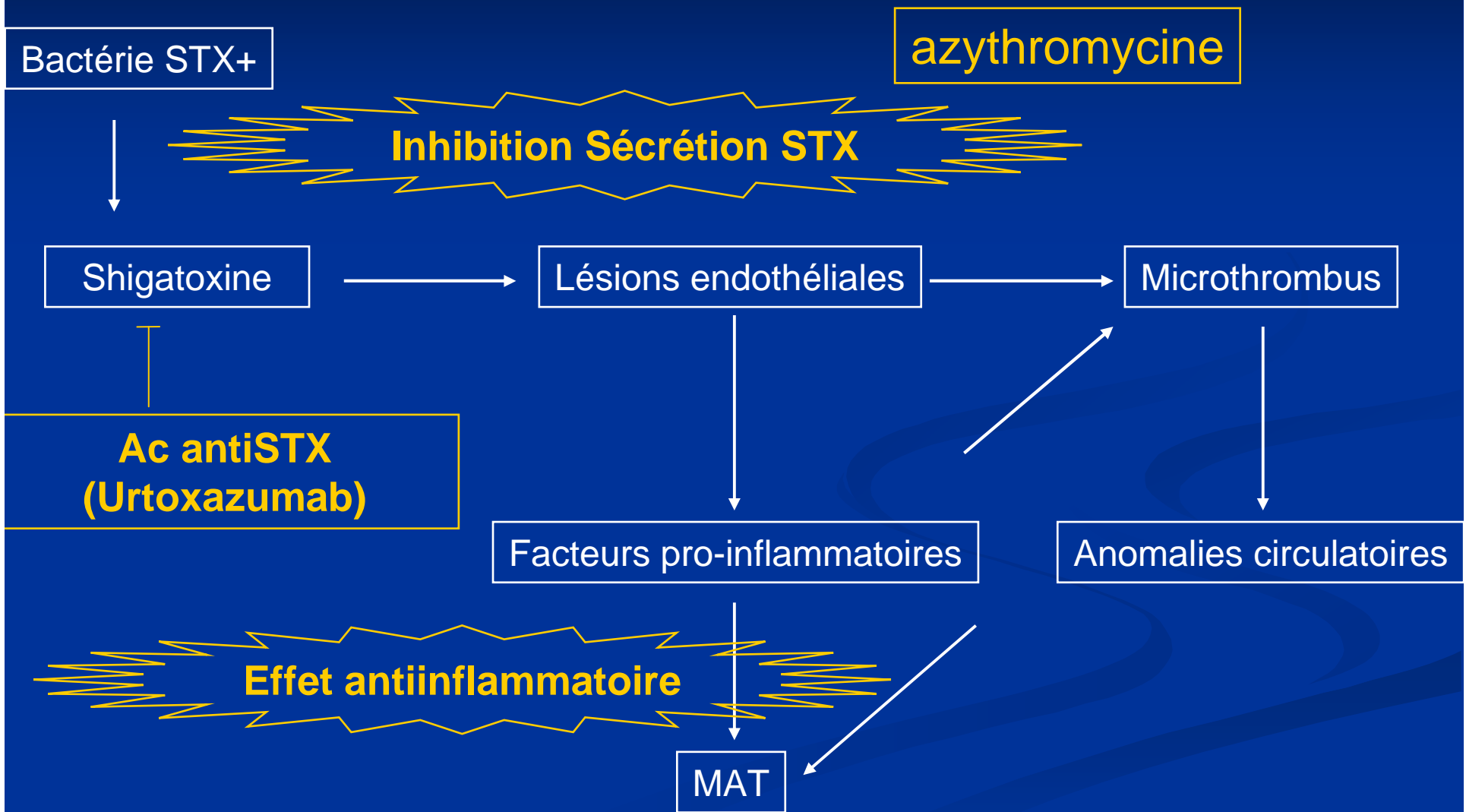
Azythromycine: inhibition de la synthèse de STX

Ohara et al. Antimicrob agents and chemother. 2002

Houdouin, CID, 2004



Cibles thérapeutiques pour un traitement spécifique du SHU D+





Cibles thérapeutiques pour un traitement spécifique du SHU D+

Bactérie STX+



Shigatoxine



Lésions endothéliales



Microthrombus



Facteurs pro-inflammatoires



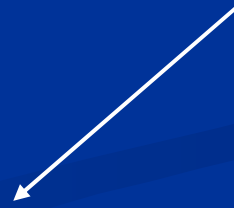
Anomalies circulatoires



**Inhibition activation
complément**



MAT





The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

CORRESPONDENCE



Complement Blockade in Severe Shiga-Toxin–Associated HUS

Lapeyraque, NEJM, 2011

L'avenir : une place pour l'Eculizumab dans le traitement du D+HUS?



Surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans

- Mise en place en 1996 à l'initiative du Pr Loirat avec dépistage STEC dans les selles dans le service de Microbiologie de l'hôpital R.Debré
- Volontariat de néphrologues pédiatres de 31 centres hospitaliers (Société de Néphrologie Pédiatrique)
- Coordination par l'Institut de veille sanitaire
- Création du Centre National de Référence des *Escherichia coli* et *Shigella* en 2002 : IP + RD
- Recherche des STEC non réalisée en routine dans les laboratoires d'analyses médicales



Résultats de la surveillance du SHU 1996-2007

- Participation constante de 31 néphrologues pédiatres
- 1035 cas de SHU notifiés pour 1996-2007 (100 cas /ans)

Incidence annuelle

- 0,8 / 100 000
- stable depuis 1996 : $< 1 / 100\ 000$ enfants ≤ 15 ans
- voisine de celle retrouvée dans les autres pays européens possédant un système similaire de surveillance
- Incidence la plus élevée chez ≤ 3 ans : 2/3 des enfants ont moins de 3 ans
- Recrudescence estivale :
 - 51% des SHU entre juin et septembre
- Régions à Densité très élevée en élevage bovin

Caractéristiques microbiologiques 1996-2007

- Confirmation d'infection à STEC : 66 %
- Sérogroupes
 - O157 : 81%
 - Autres serogroupes : O26 (6%), O103 (3%)
- Augmentation de la proportion des sérogroupes non-O157
 - période 1996-2001 : 10 %
 - période 2002-2007 : 25 %
- Infection non confirmée dans 33 % des cas identifiés
Recherche précoce dans les selles dès la survenue de la diarrhée indispensable



PREVENTION DES INFECTIONS A STEC

- Respecter les règles d 'hygiène dans la préparation de l 'alimentation (lavage des mains avant et après, en particulier après manipulation de viande de bœuf)
- Cuire en profondeur les steaks hachés de bœuf
- Ne pas donner de produits laitiers (ou autres : jus de fruits) non pasteurisés aux jeunes enfants
- Ne pas laisser les enfants se baigner dans les mares possiblement contaminées par le bétail
- Les enfants (et les adultes) doivent se laver les mains après contact avec les animaux (bétail) et avant de passer à table