

Cette recherche a été conduite au sein du Laboratoire de Santé Publique de la Faculté de Médecine de Grenoble (Leila GOFTI-LAROCHE, Denis ZMIROU, et Franck BALDUCCI) avec les partenaires suivants :

Le Laboratoire Central d'Analyse de la Générale des Eaux, Anjou-Recherche (J-C JORET, M-R De ROUBIN, et F POTY), le Laboratoire de Virologie Moléculaire du CHU de Grenoble (J-M SEIGNEURIN, B GRATACAP-CAVALLIER, et O GENOULAZ), le Laboratoire Régional d'Analyse des Eaux de l'Isère (P CHEVALLIER, Mme BOUVIER, et Mme METTET), le CAREPS, Centre Rhône-Alpes d'Epidémiologie et de Prévention Sanitaire, Grenoble (J-P FERLEY, E BAROSSO DA SILVA, et F BARRIERE), le Département EGÉRIES de l'École Nationale de Santé Publique, Rennes (J-L POTELON), le Laboratoire de Santé Publique de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 (Ph HARTEMANN), et la participation des DDASS de l'Isère (A ALEXANDRE-BIRD, L. BELLEVILLE) et de la Savoie (P. CABAGNOLS, A. GUILLOUD).

Cette recherche a aussi bénéficié de financements dans le cadre du programme 'Environnement-Santé' du Ministère chargé de l'environnement, et de la Direction Générale de la Santé.

## **1-INTRODUCTION**

### **1.1-Situation du problème**

En ce début de troisième millénaire, le risque infectieux en général, et le "péril hydrique" en particulier sont toujours d'une terrible actualité dans le tiers-monde. Dans les pays développés, après quelques décennies durant lesquelles la maîtrise de ce risque semblait acquise, les certitudes s'étiolent, et le risque infectieux associé à la consommation d'eau de boisson fait à nouveau l'objet de débats et de recherches scientifiques nourries. Les pays anglo-saxons, les Etats-Unis en tête, sans doute du fait d'un système de surveillance plus performant et réactif qu'ailleurs, ont été les premiers à devoir faire face à ce risque (ré-)émergent, à l'occasion d'épidémies de grand ampleur, avec parfois la détection de nouveaux germes, qui n'ont vraisemblablement de "nouveau" que notre aptitude technique à mieux les détecter. Dans un contexte de crises liées à l'environnement, fortement médiatisées, et d'une demande accrue de sécurité sanitaire, tant de l'opinion, que des responsables industriels et politiques, il ne suffit pas de professer que "le risque nul n'existe pas", il s'agit également de tout mettre en œuvre pour maîtriser ce qui peut l'être. Des progrès dans ce domaine sont incontestablement encore possibles. Par la recherche, la communauté scientifique peut contribuer à une meilleure maîtrise de ce risque, à travers l'amélioration des connaissances sur les micro-organismes véhiculés par l'eau de boisson (écologie, épidémiologie, détection, traitements), et à travers le développement d'outils permettant de mieux évaluer les risques sanitaires. Du fait de la variabilité inhérente au monde vivant (biologie des micro-organismes et des individus) et des incertitudes caractérisant les connaissances lacunaires du moment, la démarche d'évaluation du risque est proposée par de nombreux auteurs comme un outil pertinent pour mieux évaluer et gérer les risques infectieux d'origine hydrique. Cette démarche a été transcrite dans les textes réglementaires de différents pays anglo-saxons. Dans le reste de l'Europe, et en France en particulier, la prise de conscience de la réalité du risque infectieux résiduel associé à la consommation d'eau de boisson est plus récente, mais de nombreux programmes de recherche et de surveillance ont vu le jour au cours de ces dernières années. Le programme de recherche E.M.I.R.A, qui fait l'objet de ce travail, s'inscrit dans ce besoin de connaissance, et vise à promouvoir la démarche d'évaluation du risque microbiologique hydrique en l'appuyant sur des fonctions dose-réponse validées en population générale.

## **1.2- Généralités sur le risque infectieux hydrique**

### *1.2.2- Aperçu historique*

En dépit des formidables acquis du XX<sup>ème</sup> siècle, les maladies infectieuses d'origine hydrique continuent de poser un important problème de santé publique à travers le monde. La mise à disposition d'une eau de boisson parfaitement saine reste un élément fondamental pour maintenir ou atteindre un niveau de santé satisfaisant dans une population (Havelaar, 1997; Ford, 1999). C'est en 1848, en Angleterre, que fut étudiée pour la première fois une maladie infectieuse d'origine hydrique (Snow, 1936). Il s'agissait du choléra qui, comme d'autres grandes pathologies bactériennes historiques, telles que la dysenterie ou encore la typhoïde, sont véhiculées par l'eau (annexe 1). Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, les règles préventives élaborées par les hygiénistes, ainsi que les progrès techniques et scientifiques, ont contribué à améliorer de façon considérable l'état de santé des populations, surtout dans les pays les plus développés. Ainsi, la protection de la ressource, la filtration de l'eau, et la mise en œuvre d'une désinfection, principalement par chloration, ont été reconnues comme des moyens efficaces pour lutter contre le "péril hydrique" (Havelaar, 1997; Hellard, 1997). Aujourd'hui, la situation en matière de pathologies induites par la consommation d'eau est extrêmement contrastée, à l'échelle du globe, selon le niveau de développement des pays. L'OMS estimait en 1996 qu'environ 1,5 milliards de personnes dans le monde, dont 100 millions en Europe, ne disposaient pas encore de l'accès à l'eau potable, et que 30 000 décès journaliers dans les pays en voie de développement étaient dus à des problèmes liés à la quantité et à la qualité de l'eau (Ford, 1996). Dans la plupart des nations industrialisées, si la transmission de maladies infectieuses par voie hydrique est bien maîtrisée, grâce à l'élévation du niveau d'hygiène individuel, à la mise en place d'un système d'approvisionnement d'eau et d'assainissement satisfaisant, et d'un contrôle sanitaire s'appuyant sur une réglementation complexe, on continue cependant d'observer occasionnellement des épidémies d'origine hydrique, avec des manifestations qui prennent essentiellement la forme de gastro-entérites (Nicand, 1998). Plusieurs épidémies ont en effet été décrites aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, parfois même alors que l'eau distribuée était traitée de manière conventionnelle et respectait les critères réglementaires de qualité microbiologique (Lisle, 1995; Frost, 1996; Goldstein, 1996; Kramer, 1996; Solo-Gabriele, 1996). La létalité importante observée lors de l'épidémie de Milwaukee (Mac Kenzie, 1994) ou lors de celle de Las Vegas (Roesser, 1996) a aussi mis en lumière l'existence de groupes à risque : les jeunes enfants, les personnes

âgées, et surtout les personnes immuno-déprimées. L'augmentation de cette frange sensible de la population dans les pays développés, estimée aujourd'hui à 20% environs (Gerba, 1996), souligne, si besoin est, la nécessité de prendre sérieusement en considération le risque infectieux résiduel transmis par l'eau du robinet. Ce risque ne s'exprime pas seulement sur le mode épidémique, une vaste étude canadienne a récemment estimé que 14 à 40% des gastro-entérites observées hors épidémie, étaient attribuables à la consommation d'eau du robinet, même lorsque celle-ci respecte les critères réglementaires de la qualité microbiologique (Payment, Siemickiyti, 1997). En parallèle de ces données issues de la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses, les études portant sur la prévalence des micro-organismes dans l'eau, utilisant les nouvelles méthodes de détection, montrent que ces dernières décennies ont vu "émerger" une grande variété de pathogènes non bactériens, plus infectieux et résistants aux traitements de désinfection courants que les bactéries pathogènes historiques (Gibson, 1998; Committee report, 1999). Ainsi, aux Etats-Unis, le protozoaire *Giardia* est apparu dans les années 1960, les virus de types rotavirus et norwalk dans les années 1970, et enfin le protozoaire *Cryptosporidium* dans les années 1980 (Rose, 1997) (tableau I et annexe 2). En Europe, où les données relatives aux maladies d'origine hydriques sont quasiment inexistantes, une enquête récente portant sur la période 1986-1996 estime que dans les pays les plus performants en terme de surveillance (microbiologique et épidémiologique) 10% des épidémies sont causées par *Giardia* ou *Cryptosporidium* (Kramer, 2001). Ce chiffre est proche de celui estimé dans le contexte Nord-Américain. Les développements récents de méthodes de détection plus sensibles pour ce type de micro-organismes, telles que les techniques de biologie moléculaire ou l'immunofluorescence, ont en effet permis de retrouver ces agents pathogènes dans des échantillons d'eau, que cela soit dans un contexte épidémique (Mac Kenzie, 1994) ou non (Le Chevallier, 1991; Wallis, 1996; Nicand, 1998). Avec eux, d'autres protozoaires et virus entériques constituent sans doute un nouveau défi qu'ont à relever les autorités sanitaires et les sociétés spécialisées dans la distribution d'eau potable dans le domaine du risque infectieux associé à l'alimentation en eau.

Tableau I : Etiologie des épidémies d'origine hydrique aux Etats-Unis, pour la période, 1961-1998 (en %) \*

|                            | 1961-70 (%) | 1981-90 (%) | 1991-98 (%) |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Gastro-entérites inconnues | 30          | 44          | 40          |
| Intoxications chimiques    | 6.9         | 6           | 18          |
| <i>Giardia</i>             | 2.3         | 25          | 14          |
| <i>Cryptosporidium</i>     | -           | 1           | 10          |
| Shigella                   | 14.6        | 8           | 6           |
| <i>E.coli O157:H7</i>      | 3.1         | 1           | 4           |
| Campylobacter              | -           | 3           | 3           |
| Gastro-entérites virales   | -           | 5           | 2           |
| Salmonella                 | 6.9         | 1           | 1           |
| Cyanobacter+autres         | -           | 0.3         | 1           |
| Cholera                    | -           | 0.3         | 1           |
| Hépatite A                 | 23.3        | 4           | 0           |
| Yersinia                   | -           | 1           | 0           |
| Typhoïde                   | 10.8        | 0.3         | 0           |
| Amibiase                   | 2.3         | 0.3         | 0           |
| <b>N épisodes **</b>       | <b>-</b>    | <b>291</b>  | <b>103</b>  |

\* Selon les auteurs, ces données ne représentent que 10% de la réalité

\*\* En moyenne 510 personnes atteintes par épisode (sauf Milwaukee, 1993); les personnes les plus sensibles étant souvent plus touchées.

Sources : Craun 1992, 1993; Kramer 1996; MMWR 1998, 2000

### 1.2.2-Les critères réglementaires de la qualité microbiologique ...

La contamination de l'eau par des micro-organismes pathogènes est le danger le plus commun qui menace la qualité de l'eau de boisson. Aussi, à défaut de disposer en quantité d'eaux naturellement préservées et d'excellente qualité, on traite les ressources disponibles (eaux de surface ou prélevées dans les nappes phréatiques) pour éliminer les micro-organismes. Ces traitements comprennent des moyens physico-chimiques, tels la floculation et la filtration (qui diminuent la turbidité de l'eau), et une désinfection par des agents chimiques comme le chlore ou l'ozone, ou par des agents physiques (UV) (Montadon, 1994). En France, les normes de qualité microbiologique sont inspirées des recommandations de l'OMS qui prescrivent que « l'eau destinée à la consommation, à la préparation des aliments ou à l'hygiène personnelle, ne doit contenir aucun pathogène pour l'homme » [OMS, 1994].

Le principe élaboré au début du siècle dernier, encore en vigueur, est de garantir la qualité microbiologique de l'eau par le contrôle de l'absence des bactéries indicatrices d'une contamination fécale. En effet, le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud constituant le réservoir majeur (mais non unique) des pathogènes véhiculés par l'eau, leur présence dans les eaux utilisées pour l'alimentation en eau potable est nécessairement associée à celle des bactéries de la flore intestinale. Ces bactéries dites indicatrices sont habituellement présentes en plus grand nombre, et sont beaucoup plus aisées à mettre en évidence que les pathogènes, dont la détection est souvent coûteuse et fastidieuse en routine. Les critères de la qualité microbiologique de l'eau dans la réglementation française s'appuient donc sur la numération de « germes-tests » : coliformes totaux, coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux et spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Si cette approche pour assurer la qualité de l'eau potable a contribué, et contribue encore, et de façon majeure, à préserver un bon niveau de santé des populations, en France et à l'échelle du globe, elle ne garantit pas cependant en pratique, une protection optimale.

### *1.2.3-... et leurs limites*

Une eau du robinet exempte de bactéries indicatrices de contamination fécale n'est en effet pas forcément exempte de tout pathogène (Hellard, 2000). D'une part, les pathogènes viraux et parasitaires présentent souvent un comportement différent des indicateurs et des bactéries pathogènes quant à leur survie dans l'environnement et leur résistance aux traitements, en particulier face à la désinfection chlorée (Gerba, 1988; Haas, Crockett, 1996; Nicand, 1998). Malgré le risque sanitaire potentiel qu'ils représentent, la réglementation sur la présence des pathogènes non bactériens dans l'eau de consommation est presque inexistante en Europe. Cela est lié à l'impossibilité à l'heure actuelle d'établir des standards numériques, compte tenu des incertitudes qui pèsent encore sur les techniques de détection de ces micro-organismes (WHO, 1996). D'autre part, la persistance de pathologies digestives, quelles soient sur le mode épidémique ou endémique, dans des pays à niveau socio-économique et sanitaire élevé, avec une eau de robinet conforme aux critères bactériologiques, souligne les limites des principes qui fondent la réglementation en vigueur, et conduisent donc à rechercher des outils complémentaires pour une meilleure maîtrise des risques infectieux liés à la consommation d'eau du robinet.

### **1.3-Un outil à promouvoir en France : l'évaluation du risque microbiologique**

La démarche d'évaluation du risque a été initialement conceptualisée au cours des années 1970 dans le domaine du risque chimique cancérigène. Elle a ensuite été développée au cours de années 1990, avec des spécificités, pour le risque microbiologique d'origine hydrique, afin de permettre l'établissement de critères de qualité de l'eau sur la base de l'estimation qualitative et quantitative des risques sanitaires encourus (Covello, 1993; Gibson, 1998). La démarche d'évaluation du risque microbiologique hydrique a connu sur le continent Nord-Américain des applications majeures pour la gestion des ressources en eau potable. Ainsi, les normes relatives au traitement des eaux de surface (Enhanced Surface Water Treatment Rules) destinées à l'alimentation en eau potable ont emprunté cette démarche pour définir des objectifs d'efficacité de traitement selon la qualité de la ressource (Rose, 1997); elles ont pris comme référence le risque associé à la présence du protozoaire *Giardia lamblia*, avec un niveau maximum "acceptable" de risque infectieux fixé à  $10^{-4}$  par personne-an (US-EPA, 1989). La France qui n'a plus connu, depuis longtemps, de grandes épidémies liées à l'eau du robinet, ne peut que s'alerter de la situation sanitaire américaine et engager une réflexion entre tous les acteurs de l'eau pour actualiser les principes et compléter les outils visant à une évaluation plus structurée et une meilleure maîtrise du risque infectieux lié à la consommation d'eau du robinet. L'édition, en 1997, par la Direction Générale de la Santé, d'une brochure traitant du risque parasitaire lié à l'eau de boisson et des recommandations d'usage à l'attention des personnes immunodéprimés, a marqué le début d'une véritable prise de conscience au niveau national (DGS, 1997).

La démarche d'évaluation du risque (ER) peut être définie comme étant la caractérisation qualitative et quantitative et l'estimation des effets potentiels sur la santé de l'exposition à un danger d'origine environnementale. Pour ce qui concerne l'ER associée à l'eau de boisson, les autorités américaines ont commencé à s'y intéresser au début des années 1970. Une série d'études ont été entreprises, débouchant sur un rapport de l'académie nationale des sciences en 1977. Les principes de la démarche ont été redéfinis en 1983. L'ER a été clairement séparée de la gestion des risques, et conceptualisée autant pour les effets cancérogènes que non-cancérogènes (Rose, 1997). Quatre étapes ont été distinguées : (1) *l'identification des dangers* : Il s'agit de définir la nocivité intrinsèque d'un agent contaminant, son aptitude à induire des manifestations biologiques ou sanitaires délétères; (2) *l'évaluation de la fonction*

*dose-réponse* : Il s'agit de caractériser la relation entre la dose ingérée et la probabilité de ces effets sanitaires; (3) *l'estimation de l'exposition* : Il s'agit de déterminer la taille et la nature de la population exposée, la voie, la quantité et la durée de l'exposition; (4) *La caractérisation du risque* : Il s'agit de l'intégration des 3 étapes précédentes, avec estimation de l'ampleur du problème posé en terme de santé publique. L'évaluation du risque microbiologique, par rapport au risque chimique, est caractérisée par la nécessité de prendre en compte les interactions entre les micro-organismes et leur environnement (milieu hydrique ou hôte), impliquant une grande variabilité et d'autres facteurs d'incertitude (Gibson, 1998). La méthodologie en est détaillée dans l'article I : "Evaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : un état de l'art et des perspectives", qui est présenté à la suite de ce chapitre d'introduction.

En France, l'ER chimique commence à faire école, mais l'approche reste peu développée pour ce qui est du risque microbiologique. Sans s'opposer aux critères habituels, l'évaluation quantitative du risque peut s'avérer pertinente pour optimiser la gestion des risques liés à la contamination microbiologique des ressources d'eau potable (Payment et Berte, 2000). Or, de nombreuses incertitudes pèsent sur les modèles de l'évaluation du risque et nécessitent d'être résolues. Les fonctions dose-réponse fournies par la littérature pour quelques micro-organismes pathogènes restent essentiellement fondées sur des expérimentations animales ou humaines ; les souches de micro-organismes étudiées, conservées en milieu artificiel, ont une virulence qui diffère sans doute de celle des germes en milieu naturel, et les sujets humains testés ne sont pas représentatifs de la population générale, s'agissant le plus souvent de jeunes adultes en bonne santé.

#### **1.4-Objectifs du programme de recherche**

Le programme de recherche E.M.I.R.A.(Epidemiology and Microbial Risk Assessment) a été mis en place afin de promouvoir la démarche d'ER microbiologique en l'appuyant sur des fonctions dose-réponse validées dans les conditions naturelles d'exposition des individus et de survie des pathogènes dans l'environnement. Le projet se proposait aussi d'améliorer les connaissances sur la morbidité digestive et sur l'exposition hydrique des consommateurs d'eau du robinet dans le contexte national.

Compte tenu de la complexité du protocole, une étude pilote a été mise en place en septembre 1997 afin de tester et quantifier précisément ses conditions de réalisation. Les principaux résultats de cette étude sont présentés en annexe 4. Le protocole définitif de l'étude – conduit entre octobre 1998 et février 2000 - a donc tenu compte des enseignements de cette première phase.

Au terme de cette introduction, un premier article situe la problématique de l'évaluation du risque microbiologique, en illustrant les principaux domaines dans lesquels elle a déjà été mise en œuvre pour éclairer la gestion des risques. Le premier chapitre présente le protocole de l'étude E.M.I.R.A. Dans un second chapitre sont rassemblés les résultats, décomposés en plusieurs sections : population étudiée, consommation d'eau de boisson, qualité microbiologique de l'eau distribuée, association entre la qualité virologique, puis parasitologique de l'eau, et incidence des troubles digestifs aigus, et enfin construction de la fonction dose-réponse du risque lié au protozoaire *Giardia*. Quatre articles, soumis pour publication, constitueront l'essentiel des sections "consommation d'eau de boisson", "risques liés à la qualité virologique de l'eau", "risques liés à la qualité parasitologique de l'eau", et "fonctions dose-réponse du risque lié au protozoaire *Giardia*". Le troisième chapitre discutera ces résultats, en reprenant les principaux éléments de discussion inclus dans les articles présentés et proposera quelques nouvelles voies de recherche. Enfin, une conclusion tentera de dégager les enseignements généraux de ce travail.

**1.5-Article I : Evaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : un état de l'art et des perspectives**

**EVALUATION DU RISQUE MICROBIOLOGIQUE D'ORIGINE  
HYDRIQUE : UN ETAT DE L'ART ET DES PERSPECTIVES**

**WATERBORNE MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT :  
A STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES**

*GOFTI L<sup>1</sup>, ZMIROU D<sup>1</sup>, SEIGLE MURANDI F<sup>2</sup>, HARTEMANN Ph<sup>3</sup>, POTELON JL<sup>4</sup>.*

*1 - Laboratoire de Santé Publique, GEDEXE, Faculté de Médecine de Grenoble.*

*38 700 LA TRONCHE*

*2 - GEDEXE, Faculté de Pharmacie de Grenoble*

*3 - Laboratoire de Santé Publique de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1*

*4 - Département EGÉRIES de l'Ecole Nationale de Santé Publique de Rennes*

Ce document a été élaboré avec le précieux concours de :

- Franck BALDUCCI, Laboratoire de Santé Publique de Grenoble ;
- Dominique TRICARD et Marie Laure GUILLEMOT, bureau de l'eau, sous direction de la veille sanitaire, Direction Générale de la Santé .

Que les nombreuses personnes qui ont apporté leur contribution à ce travail trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements.

---

Cet article est référencé comme suit : Evaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : un état de l'art et des perspectives. *Rev. Epidém. et Santé Publ.*, 1999, 47, 61-73

**Résumé :**

La contamination microbiologique de l'eau constitue depuis toujours le danger le plus commun qui menace la qualité de l'eau de boisson. Aujourd'hui dans les pays industrialisés, le dispositif sanitaire garantit un niveau de protection très satisfaisant pour la population. Cependant, la limite reconnue des indicateurs bactériens, ainsi que la persistance d'épisodes épidémiques, encouragent à développer des outils complémentaires pour une meilleure maîtrise du risque infectieux lié à l'eau potable. Les Etats-Unis qui, en dépit d'installations et d'eaux distribuées conformes à la réglementation, ont subi des épisodes épidémiques importants causés par des protozoaires et des virus (plutôt que par les bactéries pathogènes classiques), ont appliqué au risque microbiologique la démarche d'évaluation du risque mise au point à la fin des années 1970 pour le risque chimique. Cela leur a permis de réaliser des avancées majeures dans la gestion du risque microbiologique d'origine hydrique. La France, qui semble pour l'instant épargnée par ces épidémies, n'en demeure pas moins confrontée à la nécessité d'optimiser et d'actualiser les principes garantissant la maîtrise des risques infectieux liés à l'eau de boisson. Ce travail, après avoir souligné les limites du dispositif actuel, établit une revue de la littérature sur l'évaluation du risque microbiologique (ERM), et illustre les applications de cette démarche mise en oeuvre par les auteurs anglo-saxons. Il discute les intérêts et les limites de l'ERM dans le contexte national, en suggérant des axes de recherche.

*Mots clés :* Evaluation du risque microbiologique. Eau de boisson. Protozoaires. Virus entériques.

**Abstract :**

Microbiological contamination is the most common threat related to drinking water. In developed countries, the current health system provides a good level of protection. However, some facts point out the need to develop further tools for a better waterborne risk management. Several outbreaks occurred in the United-States in the past decade. They were most often caused by tap water contamination, associated with parasites and viruses, despite of a good compliance of the water treatment procedures with the state of the treatment art. The chemical risk assessment methodology set up at the end of the 70's can now be applied for microbiological risks. This approach allowed the U-S authorities to improve their control on waterborne infection risks. Although limited, surveillance data suggest that to date, France has not encountered such outbreaks. However, the baselines and principles of risk

management in that area should be also be optimized and updated. This work underlines the limits of the current risk management system. A literature review on the microbiological risk assessment is first presented. Applications of this methodology are then commented, advantages and limits of the microbiological risk assessment approach in France are discussed.

*Key words* : Microbiological risk assessment. Drinking water. Protozoa. Enteric viruses.

## **INTRODUCTION**

La qualité de l'eau de boisson distribuée aux consommateurs constitue depuis toujours un élément très important pour la protection de la santé publique. Au cours de ce siècle, grâce aux règles préventives élaborées par les hygiénistes, l'état de santé des populations s'est considérablement amélioré, surtout dans les pays industrialisés [1, 2]. Le principal risque pour la santé lié à l'eau de boisson demeure la contamination microbiologique des ressources, essentiellement par des germes d'origine fécale. Pour garantir la qualité microbiologique de l'eau, le principe élaboré au début du siècle, et qui se perpétue, est de contrôler l'absence des bactéries indicatrices d'une contamination fécale au moyen de la numération de « germes-tests » (coliformes totaux, coliformes thermo-tolérants, streptocoques fécaux et spores de clostridies sulfito-réductrices). Ces bactéries, habituellement en plus grand nombre par rapport aux pathogènes dans les eaux contaminées, sont en effet beaucoup plus aisées à mettre en évidence que les pathogènes eux-mêmes, dont la détection est souvent fastidieuse, coûteuse, voire impossible en routine.

Le dispositif actuel garantissant la qualité microbiologique de l'eau de boisson connaît certaines limites. Le traitement par le chlore, procédé de désinfection le plus répandu à travers le monde, y compris dans les pays industrialisés, en particulier dans les réseaux de distribution des petites localités, est peu efficace contre certains pathogènes viraux ou parasitaires [3- 5]. De ce fait, une eau de robinet traitée par le chlore dans laquelle on ne retrouve pas d'indicateurs bactériens n'est pas nécessairement exempte de tout pathogène. Divers épisodes épidémiques en Amérique du Nord et en Grande-Bretagne se sont produits avec une eau conforme aux critères bactériologiques [6- 9]. L'analyse des épidémies liées à l'eau de boisson aux Etats-Unis a montré qu'entre 1984 et 1992, toutes les épidémies de cryptosporidiose ont eu lieu avec des installations de traitement produisant une eau sans indicateurs bactériens ; entre 1993 et 1994, les coliformes n'étaient détectés que dans 55,6% des épidémies causées par des protozoaires, contre 91,6% des épidémies d'origine

bactérienne (ou d'origine inconnue) [10]. Pour certaines épidémies de gastro-entérites, l'agent responsable n'a pas été identifié mais a souvent été supposé viral [11]. Au Canada, une étude épidémiologique a attribué à l'eau du robinet plus de 30 % des cas de gastro-entérites apparaissant sur un mode endémique dans une population pourtant alimentée par une eau répondant aux rigoureux critères de qualité microbiologique Nord Américains [12]. Ces études posent donc la question de l'adéquation de la réglementation en vigueur pour la prévention des infections d'origine hydrique. S'il s'avère illusoire de prétendre délivrer une eau exempte de tout pathogène, les principes de gestion du risque doivent cependant être actualisés en tentant de définir des niveaux de risque qui pourraient être jugés comme négligeables, y compris pour les segments les plus sensibles de la population (jeunes enfants, personnes âgées, femmes enceintes, patients cardiaques, immunodéprimés) qui représentent une fraction croissante de la population dans les pays industrialisés [13].

La France n'a enregistré jusqu'à présent que de petites épidémies liées à l'eau du robinet, mais les insuffisances du dispositif de surveillance épidémiologique ne permettent pas d'affirmer que cela traduise pleinement la réalité. La France n'est donc pas à l'abri d'épidémies de grande ampleur comme cela a été le cas des Etats-Unis. Il apparaît donc important de se préoccuper des impacts sanitaires potentiels liés aux teneurs (souvent faibles) de pathogènes résiduellement présents dans des eaux, même correctement désinfectées au vu des critères actuels sur la qualité de l'eau. Pour cela, la démarche d'évaluation du risque a montré outre-Atlantique son intérêt dans la gestion des risques infectieux d'origine hydrique. L'objectif de ce travail est de présenter la démarche d'évaluation du risque microbiologique (ERM) lié à l'eau de boisson, en illustrant ses applications, ses intérêts et ses limites.

## **LA DEMARCHE D'EVALUATION DU RISQUE MICROBIOLOGIQUE**

La démarche d'évaluation du risque a été conceptualisée sur le continent Nord-Américain, et mise en oeuvre initialement dans le domaine du risque chimique [14, 15]. Elle y a rapidement connu des développements méthodologiques et des applications dans le domaine du risque microbiologique d'origine hydrique qui restent méconnus en France.

**(1) L'identification du danger** s'appuie sur plusieurs types de données [11, 13, 16, 17]. Une veille épidémiologique performante est une nécessité. Elle permet en effet de disposer d'informations sur (1) l'incidence des épisodes épidémiques, (2) les taux d'attaque pour les différentes infections observées, (3) les taux d'hospitalisation, voire les taux de mortalité,

ainsi que sur (4) les taux de transmission secondaire des infections et (5) l'existence de populations vulnérables comme les jeunes enfants, les personnes âgées, les patients neutropéniques ou au stade IV du VIH. Faute de données françaises performantes, les statistiques de surveillance épidémiologique des Etats-Unis et de Grande-Bretagne montrent que les micro-organismes d'origine hydrique qui émergent comme une menace pour la santé publique sont essentiellement des protozoaires (*Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*) [6, 7, 18, 19] et des virus entériques, notamment les entérovirus (polio, écho, coxsackie, virus de l'hépatite A), les rotavirus, les réovirus, les norwalk-like virus et les adénovirus [20].

La nocivité des nombreux agents pathogènes est souvent bien connue, mais moins nombreux sont les pathogènes pour lesquels des doses minimales infectantes (DMI) ou des doses infectieuses pour 50% des sujets (DI<sub>50</sub>) ont pu être établies, que ce soit sur l'animal ou encore moins sur l'homme. Les expériences consistent à faire ingérer différentes doses de pathogènes, conservés en milieu nutritif, à des animaux de laboratoire. Les données humaines sont parfois issues du système de surveillance épidémiologique ou recueillies lors d'épisodes épidémiques [21, 22]; elles sont plus rarement issues d'expérimentations cliniques sur des volontaires en bonne santé. La DMI ou la DI<sub>50</sub> caractérisent l'**infectivité** du micro-organisme (capacité à survivre et/ou se développer dans le corps de l'hôte). L'infectivité des virus et des protozoaires est de 10 à 1000 fois supérieure à celle des bactéries pathogènes à un niveau similaire d'exposition [16]. Peu de données en revanche sont disponibles sur la **virulence** (la capacité du micro-organisme à induire des troubles cliniques chez le sujet infecté) [23]. Ainsi, la gamme des virulences observées dans la famille des entérovirus s'étend de 1 à 97%, ce qui conduit les experts à recommander 50% comme estimation moyenne de la virulence en l'absence de données spécifiques [24]. Les connaissances sur la **létalité** des pathogènes sont encore plus restreintes. Pour les virus autres que le virus de l'hépatite A (0.5 à 1.8 %) [11], une létalité de 1‰ (1 décès pour 1000 malades) apparaît comme une estimation moyenne, établie à partir de la mortalité observée lors d'épidémies d'origine hydrique [24]. 1% semble une estimation conservatrice pour les virus les plus pathogènes [25].

L'infectivité et la virulence des pathogènes dépendent de l'état immunitaire des hôtes. Ainsi, les jeunes enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés présentent un risque d'infection au Rotavirus et au Coxsackievirus plus important que la population générale [26]. La DI<sub>50</sub> de *C. parvum*, qui est de 132 oocystes chez des volontaires sains [27], serait de 1 oocyste pour un patient VIH+ [28].

(2) **L'identification des fonctions dose-réponse** est fondamentale. Les modèles de probabilité d'infection ont été développés à partir d'expériences qui consistaient à faire ingérer différentes doses de pathogènes à des animaux de laboratoire ou à des humains volontaires. Pour chaque pathogène, le modèle de relation dose-réponse retenu est celui qui s'ajuste le mieux à l'ensemble des données expérimentales (ou aux rares observations épidémiologiques) [29], et qui fournit l'estimation la plus conservatrice lors de l'extrapolation aux faibles doses. L'analyse de la littérature montre que 3 modèles sont couramment décrits. Il s'agit de modèles sans seuil (ce qui a une logique biologique car les micro-organismes sont capables de se multiplier dans l'hôte) [30] :

- Le modèle **log Normal**, dont l'emploi tend à disparaître car il s'ajuste finalement peu aux données :  $P = (1/\sqrt{2\pi}) \int_{-\infty}^z \exp(-z^2/2) dz$ , où  $z = (\log N - \mu) / \sigma$ , avec  $\mu$  et  $\sigma$  représentant respectivement le moyenne géométrique et l'écart-type géométrique de la distribution caractérisant la DMI des individus.

- Le modèle **exponentiel** :  $P = 1 - \exp(-rN)$ , où **P** est la probabilité d'infection d'un individu exposé à une dose moyenne **N** de micro-organismes, et **r** est une constante représentant la probabilité de survie du germe ingéré dans l'hôte. Ce modèle semble décrire le mieux la relation dose-réponse de *Giardia lamblia* et de *Cryptosporidium parvum*.

- Le modèle **Bêta-Poisson** :  $P = 1 - (1 + N/\beta)^{-\alpha}$  ou :  $P = 1 - [1 + N(2^{1/\alpha} - 1)/N50]^{-\alpha}$ , où **N50** est la dose infectieuse moyenne. Il dérive du modèle exponentiel à la différence que la probabilité de survie du germe n'est pas considérée comme une constante mais comme une quantité aléatoire définie par une fonction de distribution  $f(r)$ . Ce modèle part du postulat que la probabilité de survie d'un micro-organisme dans le tissu cible de l'hôte suit une loi bêta de paramètres **a** et **b**. Selon différents auteurs, le modèle bêta semble le plus pertinent pour de nombreux micro-organismes, en particulier les entérovirus.

Les paramètres des fonctions dose-réponse actuellement publiés dans la littérature pour quelques micro-organismes pathogènes sont présentés en annexe. La probabilité **P** fournie par le modèle représente le risque journalier d'infection pour une exposition donnée. Le risque pour une année d'exposition est estimé par :  $P_{an} = 1 - (1 - P)^{365}$  car les événements infectants sont considérés comme indépendants les uns des autres [30 ; 31].

(3) **L'estimation de l'exposition** aux pathogènes véhiculés par l'eau de boisson conduit à évaluer la prévalence dans l'eau consommée des micro-organismes étudiés, et la consommation d'eau de la population.

La fréquence et l'intensité de la contamination de l'eau varient dans le temps et en fonction de la géographie. Dans les régions tempérées, on observe dans les eaux usées des

concentrations maximales d'entérovirus au début de l'automne, et de Rotavirus pendant l'hiver [32]. Au Canada, la prévalence de *Giardia* tend à être supérieure au printemps et à l'automne, mais cela n'est pas la règle [33, 34]. La prévalence d'un micro-organisme est spécifique à chaque site et ne peut donc pas faire l'objet d'une extrapolation d'un site à l'autre. Contrairement à une pratique devenue courante, la densité microbienne doit être décrite par la moyenne arithmétique des concentrations mesurées dans le milieu et non la moyenne géométrique [35]. Il est d'usage de faire des estimations en se plaçant dans une hypothèse de « worst case » (situation la plus péjorative) ; il faut alors utiliser le pic mesuré de concentration. Lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la distribution des micro-organismes, mais seulement de la densité moyenne, on peut empiriquement déterminer le pic :  $\text{pic} = 3 \times \text{densité moyenne}$  [31]. L'hypothèse la plus largement reprise par les auteurs est que la distribution des germes est gouvernée selon une distribution statistique de Poisson dans la ressource ainsi que dans l'eau après traitement. Lorsque l'eau distribuée est traitée et que l'on ne dispose pas de la densité des germes en distribution, il est difficile d'apprécier l'exposition à partir des seules densités dans la ressource car les estimations des niveaux d'abattement des traitements appliqués restent entachées d'une grande incertitude.

Pour réaliser une ERM, l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) préconise de retenir la valeur de 2 litres d'eau de robinet consommés par jour pour un adulte, et la valeur de 1 litre /j pour un enfant. La prudence a guidé le choix de ces valeurs. La distribution de la consommation d'eau dans une population suit en effet une loi log normale, avec, aux Etats-Unis, une consommation moyenne de 1,95 litres d'eau de boisson /j [0,808-3,983, IC à 95%], et 1,13 litres d'eau de robinet /j [0,310-2,960], avec des différences sensibles selon les tranches d'âge [36]. Ainsi, seulement 10 % de la population américaine consomme plus de 2 litres d'eau de robinet par jour. Chaque fois que cela est possible il faut utiliser les données d'enquêtes de consommation réalisées sur la population cible de l'ERM.

**(4) La caractérisation quantitative du risque infectieux** synthétise les informations recueillies lors des étapes précédentes. Pour un micro-organisme de pathogénicité connue, présent avec une densité donnée (ou estimée) dans l'eau distribuée, il est possible - grâce à la modélisation de la relation dose-réponse - d'estimer le risque sanitaire encouru par une population dont le niveau de consommation a été correctement évalué. Pour tenir compte des imperfections de la démarche, le risque doit être présenté avec un intervalle de confiance qui incorpore les différentes incertitudes attachées aux composants du calcul. Cet intervalle est aujourd'hui classiquement estimé par des méthodes statistiques de type modélisation de Monte-Carlo [37]. Les estimations du risque, bornées dans les intervalles d'incertitude,

peuvent alors être positionnées par rapport à un niveau de risque « acceptable » fixé au préalable. A titre d'exemple, l'US-EPA a borné le risque chimique carcinogène jugé acceptable entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  sur une vie entière, et le risque microbiologique à  $10^{-4}$  par personne et par an [38].

Il peut être intéressant de noter que la démarche d'ERM lié à l'eau de boisson peut s'appliquer au risque lié aux eaux récréatives contaminées, moyennant quelques aménagements, notamment pour ce qui concerne l'exposition.

## **QUELQUES APPLICATIONS DE LA DEMARCHE**

(1) L'épidémie de cryptosporidiose à Milwaukee (Etats-Unis), au printemps 1993, a été l'occasion de confronter l'estimation du risque sanitaire fournie par la démarche d'ERM avec l'impact réellement observé sur le terrain grâce au dispositif de surveillance sanitaire. Les données épidémiologiques, ainsi que les hypothèses de la démarche d'ERM (tableau I), ont permis d'estimer la concentration moyenne des oocystes qui devaient se trouver dans l'eau de robinet les jours de l'épidémie : 1,23 oocystes /litre [0,42-4,5, IC à 95%]. Les analyses réalisées rétrospectivement sur des glaçons ont permis d'estimer la concentration réelle des oocystes pendant l'épidémie : 0,79 oocyste /l, valeur qui entre dans l'intervalle de confiance estimé par l'ERM. Les 2 approches ont donc fourni des estimations cohérentes.

(2) Le risque de décès vie entière lié à l'ensemble des pathogènes véhiculés par voie hydrique a été estimé aux Etats-Unis, pour des populations sensibles, à partir de données descriptives sur la distribution des pathogènes et des statistiques de surveillance épidémiologique. En utilisant la létalité des pathogènes les plus dangereux (1% pour la population générale) augmentée d'un facteur de 10 pour les populations sensibles, le risque de décès est de l'ordre de  $7 \times 10^{-4}$  sur une vie entière, niveau de risque considéré comme inacceptable pour les produits chimiques[25].

(3) Les risques liés aux virus entériques sont souvent considérés par groupe alors qu'il est plus intéressant de cibler les agents présentant les risques les plus significatifs. Récemment, des ERM liée au Rotavirus ont été conduites aux Etats-Unis où la surveillance épidémiologique montre que le Rotavirus est un agent majeur de gastro-entérites, responsable de formes sévères chez l'enfant, les personnes âgées et les patients immunodéprimés (tableau II). L'immunité protectrice est de courte durée. Toutes les épidémies documentées, causées par le Rotavirus entre 1977 et 1989, ont été associées à une contamination fécale directe de l'eau d'alimentation et/ou à un traitement inapproprié [13,

26]. Ce constat ne peut pas s'appliquer à la France, compte tenu des observations de son système de surveillance épidémiologique.

En considérant ces faits, et en partant de données sur la prévalence du Rotavirus dans les eaux de boisson retrouvées aux Etats-Unis (moyenne géométrique de 0.004 germe/l et concentration maximale détectée de 100 germes/l), les auteurs ont estimé l'impact sanitaire lié au Rotavirus (tableau III). Le risque de décès encouru par les personnes âgées est de 100 fois supérieur à celui de la population générale. Il est considérable, même pour les valeurs moyennes de concentration virale souvent rencontrées aux Etats-Unis.

(4) La prise de conscience de la nocivité des amibes libres, témoins assez banals de notre environnement aquatique, tient à la survenue d'accidents très rares mais gravissimes, contractées lors de baignades en piscines ou en eaux douces, de méningo-encéphalites aiguës primitives (MEAP). En France, une démarche d'ERM a été menée pour évaluer le risque de MEAP pour l'homme, lié à la présence de *Naegleria fowleri* lors d'une baignade [39]. Un recueil très complet des données de l'expérimentation animale et des données humaines (épidémiologiques et cliniques), une évaluation de l'exposition potentielle à *N. fowleri* (à partir de données sur son écologie générale et humaine) et l'emploi des trois modèles de fonction dose-réponse, ont permis de quantifier les risques (tableau IV).

Pour *N. fowleri*, le modèle bêta est le plus pessimiste. S'il reflétait la réalité, on devrait observer une incidence de MEAP beaucoup plus élevée sur le terrain (même en tenant compte des sous-estimations) : les modèles log normal et exponentiel semblent donc plus réalistes et plus compatibles avec le risque de MEAP observé de  $3,85 \times 10^{-07}$ , établi pour une abondance de 1 à 10 *N. fowleri* par litre d'eau [39].

(5) **L'ERM a été utilisée pour la fixation des valeurs de référence des eaux consommées ou des ressources, et pour la détermination des objectifs d'efficacité de traitement.** Pour l'élaboration des limites de qualité relatives au traitement des eaux de surface destinées à l'alimentation en eau potable («Surface Water Treatment Rule » ou SWTR [40]), *Giardia lamblia* a été choisi comme pathogène traceur du risque infectieux. Les SWTR imposent aux entreprises de mettre en oeuvre un traitement tel que le niveau maximum de risque morbide associé à la présence de *G. lamblia* soit inférieur à  $10^{-4}$  par personne-an [25]. Selon la qualité des eaux de surface, cela peut imposer des efficacités de la chaîne de traitement pour l'abattement des concentrations du protozoaire de 4 à 5 ordres de grandeur (échelle  $\log_{10}$ ) [41, 42]. Ainsi, pour des ressources fortement polluées [ $0.148-3.3 \times 10^{-3}$  pathogènes /l], plus de 4 log de réduction par traitement sont requis pour ne pas dépasser le risque acceptable [16].

Le même raisonnement a été appliqué pour le *Cryptosporidium*, en supposant que le traitement préconisé par les SWTR assure 3 log de réduction. La concentration moyenne dans l'eau brute qui n'entraîne pas un risque supérieur au risque acceptable ( $10^{-4}$ ) a alors été estimée à 2 oocystes /100 litres [18].

La démarche d'ERM a permis de déterminer pour différents micro-organismes présentant un intérêt sanitaire, les concentrations dans l'eau distribuée qui permettent de respecter le risque acceptable de  $10^{-4}$  par personne-an (tableau V) [24]. Pour *Cryptosporidium parvum*, la concentration dans l'eau distribuée rencontrant le risque de  $10^{-4}$  personne-an a été estimée à  $3,27 \times 10^{-5}$  oocystes/litres, soit 0,003 oocyste /100 l [0,0018-0,0064 /100 l, IC à 95%] [18].

En l'état actuel des données concernant la mesure de la prévalence des pathogènes viraux ou parasitaires dans les eaux destinées à l'alimentation en eau potable ou dans les eaux distribuées en France, de tels exercices sont malheureusement encore impossibles à réaliser .

## DISCUSSION

La démarche d'ERM, qui vise à dégager les éléments pertinents pour la décision en santé publique, présente certains avantages majeurs. La littérature a montré qu'il est possible de déterminer, en fonction d'un risque « acceptable » fixé a priori, une concentration maximum admissible dans l'eau consommée (= concentration critique Cc). Cela facilite la détermination des moyens à mettre en œuvre pour respecter les valeurs limites établies. A partir de la Cc, des limites de qualité ou des règles peuvent être fixées à rebours pour une ou plusieurs étapes entre le robinet du consommateur et la ressource. Il est possible, en particulier, de fixer la concentration moyenne théorique acceptable dans l'eau brute (Cm) [24]:

$$C_m = C_c \cdot \frac{100}{100 - T} \cdot \frac{R}{I}$$

où Cc est la concentration critique de micro-organismes dans l'eau distribuée

T est le pourcentage d'élimination ou d'inactivation du traitement

R est le rendement de détection de l'analyse

I est la probabilité que le germe détecté soit infectant

Il devient ainsi possible de définir des objectifs de qualité des ressources et d'établir un classement pour l'utilisation prioritaire de celles qui sont les moins contaminées, ou de définir les objectifs d'efficacité de traitements applicables à des ressources de qualité donnée

de façon à optimiser l'adéquation entre le traitement et la qualité de l'eau brute. Cela peut conduire à fixer des règles techniques de protection au niveau des captages, et/ou à dimensionner le traitement en fonction de la qualité des ressources disponibles. Selon une autre logique, l'ERM peut guider les décisions à prendre dans le cadre de la gestion des risques sanitaires en cas de présence de germes dans l'eau distribuée. En effet, des incidents ou dysfonctionnements (présence de pathogènes) peuvent se produire en différents endroits, de la ressource à la distribution, malgré tous les soins apportés. Dans une telle situation, l'ERM représente une aide pour gérer avec discernement la « crise ». En effet, connaissant la concentration du ou des pathogènes, on peut évaluer l'impact sanitaire et définir le temps pendant lequel le dépassement peut être toléré sans dommages pour la santé des populations cibles. Il est envisageable en particulier de spécifier d'éventuelles restrictions d'usage en fonction des risques encourus. L'ERM peut donc aider à gérer un dysfonctionnement du système d'alimentation en eau potable en répondant à un certain nombre de questions : (1) si la pollution survient au niveau de la ressource, est-il nécessaire d'arrêter le captage, de modifier la gestion de l'installation, de mettre en place un traitement complémentaire (pour éviter le passage du contaminant dans l'eau distribuée) ? (2) en cas de défaillance au niveau du traitement ou du réseau : le délai nécessaire pour corriger la situation est-il compatible avec le risque sanitaire engendré ? (3) si le dysfonctionnement se situe au niveau de l'eau distribuée, quelle est la signification d'un dépassement de la norme ? En fonction du risque sanitaire, il faudra alors identifier les populations concernées et les différencier en fonction de leur sensibilité pour communiquer ou non des recommandations d'usage de l'eau.

La démarche d'ERM rencontre cependant des limites qui devraient conduire à développer des axes de recherche. La validité de la modélisation reste encore fragile. L'extrapolation de l'animal à l'homme, et des fortes aux faibles doses, constitue une faiblesse de l'évaluation du risque dans le domaine du risque microbiologique comme dans celui du risque chimique, ce qui nécessiterait des validations épidémiologiques. Cela passe par la validation des DMI, des paramètres d'infectivité et de virulence, en étudiant le risque sanitaire encouru par des populations dans les conditions naturelles d'exposition et de survie des micro-organismes. En effet, actuellement, la modélisation est développée dans des conditions contrôlées avec des souches de pathogènes conservées en milieu artificiel dont les caractéristiques diffèrent certainement de celles des souches sauvages. La modélisation considère la population générale comme un ensemble homogène d'individus ayant la même sensibilité à une exposition donnée; elle ne prend pas en compte le fait que la population à

laquelle s'applique le risque présente un état de santé globalement inférieur de celui des volontaires qui ont servi à « étalonner » les modèles [18, 29].

La connaissance de l'exposition des populations est tout à fait parcellaire, particulièrement en France. Pour y répondre, il faut réaliser des enquêtes pour disposer de données sur la consommation d'eau de robinet de la population française. Il est également important que des campagnes de mesure soient conduites afin de décrire la prévalence des principaux micro-organismes pathogènes dans les eaux destinées à l'alimentation en eau potable. Cela appelle notamment le développement de techniques de détection et d'identification des différents micro-organismes, et de détermination de leur viabilité et de leur infectivité.

La surveillance épidémiologique des maladies d'origine hydrique est insuffisamment développée en France. Les données américaines n'étant pas forcément représentatives de la situation des pays européens, un meilleur report des épidémies serait donc souhaitable [21] pour mieux cibler les pathogènes d'intérêt sanitaire et pour mieux enregistrer toutes les informations qui pourront être réinjectées dans la démarche d'ERM [42].

L'application de la démarche d'évaluation du risque pour la gestion des risques microbiologiques implique de ne plus raisonner en terme de risque nul, illusoire en réalité, mais en terme de risque sanitaire « acceptable » ou de risque consenti. Fixer une telle valeur ne relève plus seulement de la démarche scientifique, mais de la décision politique qui prend aussi en considération des paramètres autres que les arguments sanitaires [25]. Le niveau de risque est à un point d'équilibre entre ce qui est socialement et économiquement acceptable, et techniquement faisable. Les conséquences sanitaires d'une gastro-entérite étant limitées chez les individus immunocompétents, définir un risque « acceptable » et le niveau de concentration correspondant, est concevable. En revanche, pour des individus « sensibles », ce même niveau de concentration pourrait engendrer un risque excessif. Face à des risques difficilement réductibles, une politique moderne de gestion des risques peut-elle s'appuyer à la fois sur la définition d'objectifs de qualité consentant un niveau de risque minime et, pour les personnes les plus sensibles, sur des procédures d'une autre nature (précautions d'usage en particulier) ? A l'évidence, il s'agit là d'un débat social et politique plus que scientifique, qui justifie la nécessaire séparation entre la démarche d'évaluation du risque (expertise scientifique) et la gestion du risque (décision politique).

En France, pour diverses raisons, le dispositif sanitaire n'utilise pas la démarche d'ERM alors qu'elle offre un cadre pertinent pour rationaliser la gestion des risques liés à l'eau potable. D'une part, les approches probabilistes ne sont pas encore intégrées dans les

processus décisionnels. D'autre part, avant d'être en mesure de rendre opératoire cette approche par les services chargés de la police sanitaire et les responsables des circuits de distribution de l'eau, il importe de lever les nombreuses incertitudes scientifiques qui demeurent et qui empêchent encore une évaluation parfaitement fiable du risque microbiologique d'origine hydrique.

## **CONCLUSION**

Les principes actuels de gestion du risque microbiologique d'origine hydrique, tels qu'ils sont développés dans les recommandations de l'OMS, demeurent d'une grande pertinence. Ils ont fait la preuve de leur grande efficacité car ils ont permis d'atteindre, en France comme partout où ils étaient appliqués rigoureusement, des niveaux de santé très satisfaisants. On reste cependant confrontés à certaines de leurs limites, ce qui appelle la mise en oeuvre d'approches nouvelles et complémentaires pour la gestion des ressources d'eau et des risques sanitaires, tant au niveau local, que national et/ou international.

Ce travail a essayé de tracer les principes, les outils et les perspectives de l'ERM, de montrer en quoi la démarche structure et synthétise les connaissances disponibles sur la qualité microbiologique de l'eau, et fournit - malgré la persistance de nombreuses incertitudes - un outil de décision pour les responsables de l'alimentation en eau potable, aussi bien dans le contexte de gestion quotidienne des installations que dans le contexte de la surveillance sanitaire et de la détermination des normes et règles de gestion du dispositif. Cette méthode d'évaluation de l'impact sanitaire mérite donc que des efforts soient entrepris en France pour la diffusion de son application et la consolidation de ses fondements scientifiques.

## REFERENCES

- 1-Okun D-A. Water quality management. In : Last JM, Wallace RB, eds. Public Health and preventive medicine. 13<sup>th</sup> ed. 1992 : 619-648. *Prentice-Hall*. East Norwalk, Conn, USA.
- 2-Raucher RS. Public Health and regulatory considerations of the safe drinking water act. *Annu. Rev. Public Health*, 1996, 17 : 179-202.
- 3-Jarrol EL , Bingham AK , Meyer EA. Effects of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41 (2) : 483-487.
- 4-Payment P. Viruses : prevalence of disease, levels and sources. In : Craun GF, ed. Safety of water disinfection : balancing chemical and microbial risks.: ILSI Press, Washington DC , 1993 : 99-114.
- 5-Venczel LV , Arrowood M, Hurd M, Sobsey MD. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxydant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiology*, 1997, 63 : 1598-1601.
- 6-Lisle JT, Rose JB. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and the UK : a mini review. *J. Water SRT-aqua*. 1995, 44 (3) : 103-117.
- 7-Solo-Gabriele H, Neumeister S. US outbreaks of cryptosporidiosis. *AWWA*. 1996 : 76-86.
- 8-Frost FJ, Craun GF, Calderon RL. Waterborne disease surveillance. *AWWA*. Sept 1996 : 66-75.
- 9-Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O et al. Cryptosporidiosis : an outbreak associated with drinking water despite state of the art water treatment. *Ann. Intern. Med.* 1996, 124 (5) : 459-468.
- 10-Kramer MH, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon RL, Juranek DD. Surveillance of waterborne diseases outbreaks, US, 1993-94. *AWWA*. 1996, 88 (9) : 66-80.
- 11-Haas CN, Rose JB, Gerba C, Regli S. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk analysis*. 1993, 13 (5) : 545-552.
- 12-Payment P, Richardson L, Siemiatycki J, Dewar R, Edwardes M, Franco E. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am. J. Public Health*. 1991, 81 : 703-708.
- 13-Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree KD. Waterborne Rotavirus : a risk assessment. *Wat. Res.* 1996, 30 (12) : 2929-2940.

- 14-NAS-NRC. National Research council. Risk assessment in the federal government : managing the process. NAS-NRC committee on the institutional means for assessment of risks to public health. Nat. Acad. Press, Washington DC. 1983.
- 15-Covello VT , Merkhofer MW. Risk assessment methods. Approaches for assessing health and environmental risks. Plenum press, New York. 1993.
- 16-Rose JB, Gerba CP. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Wat. Sci. Tech.* 1991, 24 : 29-34.
- 17-Rose JB, Haas CN, Gerba CP. Waterborne pathogens assessing health risks. *Health. Environ. Digest.* 1993, 7 (3) : 1-3.
- 18-Haas CN, Crockett CS, Rose JB, Gerba CP, Fazil AM. Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *AWWA*, 1996 : 131-136.
- 19-Steiner TS , Thielman NM , Guerrant RL. Protozoal agents : what are the dangers for the public water supply ? *Annu. Rev. Public Health* 1997, 48 : 329-340.
- 20-Gerba CP, Haas CN. Assessment of risks associated with enteric viruses in contaminated drinking water. *ASTM.STP.* 1988, 976 : 489-494.
- 21-Hartemann Ph, Newman R, Foliguet J.M. Epidemiology of infectious diseases transmitted by drinking water in developed countries. *Rev. Epidem. et Santé Pub.* 1986, 34 : 59-68.
- 22-Hedberg CW, Osterholm MT. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, 6 (3) : 199-210.
- 23-Ewald PW. Waterborne transmission and the evolution of virulence among gastrointestinal bacteria. *Epidemiol. Infect.* 1991, 106 (1) : 83-119.
- 24-Regli S, Rose JB, Haas CN, Gerba CP. Modeling risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *AWWA*. 1991, 83 : 76-84.
- 25-Macler BA. Acceptable risk and U.S. Microbial drinking water standards. In : Safety of water disinfection : balancing chemical and microbiological risks. Craun.G.F. (ed), ILSI Press, Washington DC. 1993 : 619-623.
- 26-Crabtree KD, Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Risk assessment of waterborne Rotavirus and Coxsackievirus. *WATC.* 1995 : 789-811.
- 27-Dupont HL, Chappel CL, Sterlling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332 (13) : 855-859.
- 28-Roefer PA, Monscvitz JT, Rexing DJ. The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak. *AWWA* 1996 : 95-106.

- 29-Haas CN, Rose JB. Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology : the case of the Milwaukee outbreak. Proc. Ann. Conf. AWWA. New York, 5-9 June 1994 : 517-522.
- 30-Haas CN. Estimation of risk due to low doses of micro-organisms : a comparison of alternatives methodologies. *Am. J. Epidemiol.* 1983, 118 (4) : 573-582.
- 31-Haas CN. Quantifying microbiological risks. In : Safety of water disinfection : balancing chemical and microbiological risks. Craun.G.F. (ed), ILSI Press, Washington DC. 1993 : 389-398.
- 32-Montadon PE. Utilisation de la méthode PCR pour la recherche des micro-organismes dans l'eau. *Schweiz. Rundschau Med. (PRAXIS)*. 1994, 83 (20) : 630-637.
- 33-Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, VAN Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp isolated from drinking water in Canada. *Appl. Envir. Microbiol.* 1996 : 2789.
- 34-Isaac-Renton J, Moorehead W, Ross A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies : cyst levels, parasite viability, and health impact. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62 (1) : 47-54
- 35-Haas CN. How to average microbial densities to characterize risk. *Wat. Res.* 1996, 30 (4) : 1036-1038.
- 36-Rosebury AM, Burmaster DE. Log normal distributions for water intake in children and adults. *Risk Analysis.* 1992, 12 : 99-104.
- 37-US-EPA. Guiding principles for Monte-Carlo analysis. EPA/630/R 97/001. 1997.
- 38-US-EPA. National primary drinking water regulations. Final rule. Fed. Reg. 54 : 27486-27541. 1989.
- 39-Bard D, Siclet F. Amibes libres et santé publique, essai d'évaluation de risque. ENSP éditeurs, EDF. 1995.
- 40-Le Chevallier MW, Norton WD, Lee RG. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp.in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57 : 2617-2621.
- 41-US-EPA. Office of ground water and drinking water. Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources. EPA report n°570/9-29-018. Washington DC. 1991.
- 42-Rose JB, Haas CN, Regli S. Risk assessment and control of waterborne Giardiasis. *Am. J. Public. Health.* 1991, 81 (6) : 709-713
- 43-Thacker BS, Stroup FD, Parrish RG, Anderson H.A. Surveillance in environmental public health : Issues, systems, and sources. *Am. J. Public health.* 1996, 86 (5) : 633-638.

**ANNEXE : MODELES DECRIVANT LA PROBABILITE D'INFECTION PAR LES MICRO-ORGANISMES D'ORIGINE HYDRIQUE ET PARAMETRES FOURNIS PAR LA LITTERATURE**

**Equations des modèles :**

P = Probabilité de réponse d'un individu exposé à une dose de micro-organismes  
 N = Dose ingérée de micro-organismes, N = volume d'eau ingéré × densité microbienne de l'eau  
 N<sub>50</sub> (DI<sub>50</sub>) = Dose infectante de micro-organismes pour 50% des individus

- **Log normal** :  $P = (1/\sqrt{2\pi}) \int_{-\infty}^z \exp(-z^2/2) dz$   
 $z = (\log N - \mu) / \sigma$  où  $\mu$  et  $\sigma$  représentent respectivement le moyenne géométrique et l'écart-type géométrique de la distribution caractérisant la DMI des individus
- **Exponentiel** :  $P = 1 - \exp(-rN)$  où r (constante) est la probabilité de survie du germe dans l'hôte
- **Bêta** :  $P = 1 - (1 + N/\beta)^{-\alpha}$  ou  $P = 1 - [1 + N(2^{1/\alpha} - 1)/N_{50}]^{-\alpha}$   
 où  $\alpha$  et  $\beta$  sont les paramètres du modèle.

| Pathogènes                      | Modèles     | Paramètres du modèle                                      | Références |      |
|---------------------------------|-------------|---|------------|------|
| <i>Shigella dysenteriae</i>     | Log normal  | DI <sub>50</sub> = 383<br>$\mu = 2.58$<br>$\sigma = 1.36$ | [30]       |      |
|                                 | Bêta        | DI <sub>50</sub> = 500<br>a = 0.5<br>b = 100              | [30]       |      |
| <i>Shigella flexneri</i>        | Bêta        | DI <sub>50</sub> = 64000<br>a = 0.2<br>b = 2000           | [30]       |      |
| <i>Coxsackievirus (type B4)</i> | Exponentiel | r = 7.75*10 <sup>-3</sup>                                 | [26]       |      |
| <i>Echovirus 12</i>             | Log normal  | DI <sub>50</sub> = 55<br>$\mu = 1.74$<br>$\sigma = 0.75$  | [30]       |      |
|                                 | Exponentiel | DI <sub>50</sub> = 58<br>r = 0.012                        | [30]       |      |
|                                 | Bêta        | DI <sub>50</sub> = 53<br>a<br>1.3                         | [30]       |      |
|                                 |             | b<br>75   | [30] [31]  |      |
|                                 |             | 0.374   | 187        | [24] |

|                        |             |  |                         |              |
|------------------------|-------------|--|-------------------------|--------------|
| <i>Poliovirus 1</i>    | Log normal  | DI <sub>50</sub> = 60<br>$\mu = 1.78$<br>$\sigma = 0.23$ |                         | [30]         |
|                        | Exponentiel | DI <sub>50</sub> = 57<br>$r = 0.0122$                    |                         | [30]         |
|                        |             |  | $r = 9.1 \cdot 10^{-3}$ | [24]         |
|                        | Bêta        | DI <sub>50</sub> = 47<br><b>a</b><br>15                  | <b>b</b><br>1000        | [30] [31]    |
|                        |             | 0.119  | 200                     | [30] [31]    |
| <i>Poliovirus 3</i>    | Log normal  | DI <sub>50</sub> = 3.7<br>$\mu = 0.57$<br>$\sigma = 1.0$ |                         | [30]         |
|                        | Exponentiel | DI <sub>50</sub> = 2.7<br>$r = 0.26$                     |                         | [30]         |
|                        | Bêta        | DI <sub>50</sub> = 3.4<br><b>a</b><br>0.5                | <b>b</b><br>1.14        | [30]<br>[24] |
|                        |             | 0.409  | 0.788                   |              |
| <i>Rotavirus</i>       | Bêta        | <b>a</b><br>0.232  | <b>b</b><br>0247        | [16].        |
|                        |             | 0.265  | 044                     | [11].        |
|                        |             | 0.26   | 042                     | [24] [26].   |
| <i>Entamoeba coli</i>  | Log normal  | $\mu = 1.14$<br>$\sigma = 1.74$                          |                         | [30]         |
|                        | Bêta        | <b>a</b><br>0.17   | <b>b</b><br>1.32        | [30] [31]    |
|                        |             | 0.128  | 0.581                   | [24]         |
| <i>Giardia</i>         | Exponentiel | DI <sub>50</sub> = 35                                    |                         | [31]         |
|                        |             | $r = 0.01982$  |                         | [41]         |
|                        |             | $r = 0.02$   |                         | [24]         |
| <i>Cryptosporidium</i> | Exponentiel | DI <sub>50</sub> = 132                                   |                         | [27]         |
|                        |             | $r = 0.004673$   |                         | [29]         |
|                        |             | $r = 4.2 \cdot 10^{-3}$                                  |                         | [18]         |

Tableau I : Données utilisées pour évaluer le risque infectieux pendant l'épidémie de Cryptosporidiose à Milwaukee [29].

| Hypothèses pour l'ERM*  | Données épidémiologiques  |
|---|---|
| - Virulence du <i>C. parvum</i> : 100 %   |   |
| - Modèle de fonction dose-réponse :<br>modèle exponentiel $P_i = 1 - \exp(-rN)$ | - Temps de la contamination : $t = 21$ jours<br>[intervalle, 15-30 j] |
| - Ingestion d'eau : 1948 ml/ personne-jour<br>( $\sigma = 827$ ml)              | - Taux d'attaque de l'épidémie : $\tau = 0,21$                        |
| - Indépendance des expositions itératives                                       |   |

\* ERM = évaluation du risque microbiologique

Tableau II : Taux estimés (en %) d'infections symptomatiques, de décès et d'hospitalisation chez les sujets infectés par le Rotavirus, selon le type de population [26]

|   |       |
|---|-------|
| Infections symptomatiques               | 28-60 |
| Décès                                   |       |
| - population totale                     | 0,01  |
| - sujets hospitalisés                   | 0,12  |
| - personnes âgés                        | 1     |
| - patients transplantés                 | 50    |
| Hospitalisations                        |       |
| - enfants :                             |       |
| avec confirmation clinique              | 3,6   |
| toutes admissions pour gastro-entérite  | 30-60 |
| - adultes :                             |       |
| toutes admissions pour gastro-entérites | 5-10  |

Tableau III : Risques liés au Rotavirus dans l'eau de boisson, estimés pour la population générale et pour les personnes âgées <sup>1</sup> [26]

|                      | Concentration de Rotavirus dans l'eau de boisson (nombre/litre) |                       |                       |                       |
|----------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                      | 0.004 (moyenne)   |                       | 100 (maximale)        |                       |
|                      | jour  | an                    | jour                  | an                    |
| Risque d'infection * | $4.90 \times 10^{-3}$   | $8.34 \times 10^{-1}$ | $7.99 \times 10^{-1}$ | $9.99 \times 10^{-1}$ |
| Risque de maladie *  | $2.45 \times 10^{-3}$   | $4.17 \times 10^{-1}$ | $4.0 \times 10^{-1}$  | $4.99 \times 10^{-1}$ |
| Risque de décès *    | $2.45 \times 10^{-7}$   | $4.17 \times 10^{-5}$ | $4.0 \times 10^{-5}$  | $4.99 \times 10^{-5}$ |
| Risque de décès **   | $2.45 \times 10^{-5}$   | $4.17 \times 10^{-3}$ | $4.0 \times 10^{-3}$  | $4.99 \times 10^{-3}$ |

<sup>1</sup> consommation de 2 litres / jour

\* Population générale

\*\* Personnes âgées

Tableau IV : Estimation des risques de survenue de méningo-encéphalites aiguës primitives (MEAP), en France, selon les teneurs des eaux de baignade en *N. fowleri* [39]

| Concentration/litre<br>d'eau de baignade | Risques de MEAP                               |                        |                        |
|--|---|------------------------|------------------------|
|  | en fonction du choix des modèles dose-réponse |                        |                        |
|  | Modèle log normal                             | exponentiel            | bêta                   |
| 0.01                                     | $9.68 \times 10^{-11}$                        | $4.16 \times 10^{-09}$ | $3.82 \times 10^{-07}$ |
| 0.1                                      | $9.73 \times 10^{-10}$                        | $4.16 \times 10^{-08}$ | $3.82 \times 10^{-06}$ |
| 1  | $1.01 \times 10^{-08}$                        | $4.19 \times 10^{-07}$ | $3.82 \times 10^{-05}$ |
| 10                                       | $1.45 \times 10^{-07}$                        | $4.54 \times 10^{-06}$ | $3.82 \times 10^{-04}$ |
| 100                                      | $7.24 \times 10^{-06}$                        | $1.10 \times 10^{-04}$ | $3.80 \times 10^{-03}$ |

*Tableau V : Concentrations de micro-organismes dans l'eau consommée garantissant un risque au plus  $10^{-4}$  par personne an [24]*

| Micro-organismes | nombre / litre d'eau distribuée |
|------------------|---------------------------------|
| Rotavirus        | $2.2 \times 10^{-7}$            |
| Poliovirus 3     | $2.6 \times 10^{-7}$            |
| Entamoeba coli   | $6.2 \times 10^{-7}$            |
| Giardia          | $6.8 \times 10^{-6}$            |
| Poliovirus 1*    | $1.5 \times 10^{-5}$            |
| Echovirus 12     | $6.8 \times 10^{-5}$            |
| Poliovirus 1*    | $1.9 \times 10^{-3}$            |

*\* Il s'agit de souches différentes*

## **2-MATERIEL ET METHODE**

### **2.1-Principe de l'étude**

Le protocole du programme de recherche visait à valider ou estimer les fonctions dose-réponse pour certains virus et protozoaires d'intérêt sanitaire, transmis par voie hydrique, en combinant un suivi épidémiologique de terrain intensif, et des analyses virologiques et parasitologiques de l'eau au moyen de techniques sensibles d'identification (respectivement RT-PCR et immunofluorescence). Ainsi, l'incidence des troubles digestifs aigus observés devait pouvoir être corrélée aux concentrations de pathogènes mesurées dans l'eau distribuée.

### **2.2-Suivi épidémiologique**

Pendant 9 mois, une étude longitudinale prospective a été conduite pour suivre l'apparition des troubles digestifs au sein de différents groupes en population générale. Un premier groupe était composé de personnes consommant une eau de boisson traitée mais vulnérable sur le plan de la qualité microbiologique (réseau où l'eau brute est de mauvaise qualité et où, après un traitement de désinfection chloré bien conduit, des virus et des protozoaires sont susceptibles de demeurer dans l'eau distribuée malgré l'absence d'indicateurs bactériens). On verra que cette population a été décomposée en sous-ensemble alimentés par des eaux d'origines différentes. Un autre groupe consommait une eau réputée de bonne qualité microbiologique (réseau où l'eau brute est de bonne qualité au vu des différents rapports d'experts et analyses réglementaires des années passées, ne nécessitant pas de traitement de désinfection).

#### *2.2.1-La population d'étude*

##### *2.2.1.1-Choix des communes d'étude*

Les foyers volontaires ont été recrutés dans 4 catégories de communes. Les critères de sélection des communes ont été :

➤ Pour le groupe "*eau non traitée*" : distribuer une eau souterraine non traitée dont la qualité microbiologique mesurée par les indicateurs fécaux a été parfaite depuis au moins 3 ans (résultats de la surveillance sanitaire des DDASS : conformité aux normes = 100 %); réseau

unique sans raccordement occasionnel ; qualité jugée homogène sur l'ensemble du réseau; commune à caractère non touristique.

☞ La commune de Saint Laurent du Pont (Isère, 4083 habitants au RGP de 1990) a été choisie, et sera le "groupe 1".

➤ Pour les *groupes "eau traitée"* : distribuer une eau (souterraine, de surface ou karstique) ayant subi une désinfection par chloration simple alors que l'eau brute est de qualité médiocre (au moins 10 CF/100 ml et/ou 10 SF/100 ml dans au moins 50 % des échantillons analysés depuis 3 ans); distribuer une eau habituellement (>80 %) conforme aux normes microbiologiques après traitement, sans projet de modification du système de distribution et de traitement avant le terme de l'étude ; réseau unique sans raccordement occasionnel ; qualité jugée homogène sur l'ensemble du réseau; commune à caractère non touristique, de profil socio-économique et géologique semblable au 1<sup>er</sup> groupe.

☞ Les communes d'Entre deux Guiers (Isère, 1544 habitants au RGP) et Les Echelles (Savoie, 1259 habitants au RGP) alimentées par la même ressource, ont été choisies. Elles appartiennent au même massif de la Chartreuse que St Laurent du Pont, dont elles sont distantes de 10 km. Elles constituent le " groupe 2".

☞ La commune de Drumettaz (Savoie, 1724 habitants au RGP) a aussi été choisie. La source Silien qui l'alimente est une ressource souterraine située en moraine. Elle constitue le "groupe 3".

☞ Les 7 communes de St Béron, St Alban de Montbel, Domessin, La Bridoire, Verel de Montbel, Pont de Beauvoisin, Belmont -Tramonet (totalisant près de 6000 habitants) sont alimentées par le réseau bas service du Lac d'Aiguebelette. Elles constituent le "groupe 4".

#### 2.2.2.2-Recrutement des foyers volontaires

Une rencontre avec les responsables locaux de la distribution d'eau potable dans les 4 communes d'étude a été organisée en septembre 1998, afin de présenter les objectifs et les modalités de l'enquête. Leur collaboration a été sollicitée pour le recrutement des volontaires et des sentinelles. Le recrutement s'est basé en partie sur un appel à volontaires dans les médias locaux (article dans le journal régional, le Dauphiné Libéré). Le recrutement portant principalement sur des familles avec enfants de 4 à 12 ans (groupe connu pour être le plus pertinent pour la surveillance épidémiologique des gastro-entérites), la coopération des directeurs d'école et des instituteurs a été sollicitée lors d'une visite personnalisée auprès de chaque responsable d'établissement. Il a donc été possible d'adresser un courrier aux parents d'élèves par l'intermédiaire des instituteurs ou des professeurs pour requérir leur

participation. Le recrutement a été complété par un appel à volontaires adressé par courrier à tous les foyers abonnés à l'un des 4 réseaux de distribution concernés.

Le recrutement des volontaires a nécessité la rédaction de nombreux documents (annexe) :

- \* Le document de présentation simplifiée de l'étude, sous le titre «La santé au robinet », qui a été adressé aux Maires des communes d'étude, aux professionnels de santé (médecins généralistes et pharmaciens d'officine), aux Directeurs d'école et Instituteurs de ces communes, ainsi qu'aux volontaires après leur inclusion.
- \* Le courrier d'appel à volontaires (avec coupon-réponse et enveloppe T) remis aux parents d'élèves de 11 écoles de Savoie (soit plus de 500 enfants sollicités), et également adressé à tous les foyers alimentés par les 4 réseaux d'eau considérés (près de 5000 foyers sollicités).
- \* Le document de formation de l'enquêteur téléphonique. La charge de travail a nécessité le recrutement d'une personne supplémentaire en soutien de l'enquêteur-technicien associé à l'étude depuis sa phase pilote.
- \* Le questionnaire d'inclusion des foyers volontaires comprenant des fiches familiales et individuelles, et l'attestation d'accord à remplir par le chef de famille conformément aux prescriptions de la CNIL (autorisation donnée le 24 novembre 1997).
- \* Le carnet familial d'auto-enregistrement quotidien de la morbidité digestive (32 feuillets correspondants aux 32 semaines initialement prévues pour l'enquête).
- \* Le questionnaire de consommation individuelle d'eau de boisson.
- \* La liste codée des familles volontaires et la liste d'appel des familles de chaque soir.
- \* Les documents de recueil des résultats de la surveillance épidémiologique, comprenant les fiches de suivi de ces familles, les fiches de notification des cas de troubles digestifs, et les fiches récapitulant les données hebdomadaires.
- \* La note explicative détaillant leurs fonctions aux sentinelles, et le protocole de prélèvement des échantillons d'eau de robinet destinés aux analyses bactériologiques et virologiques.
- \* Le planning des différentes campagnes de routine, ainsi que la procédure en cas d'alerte, adressés aux sentinelles, aux différents laboratoires, ainsi qu'au technicien extérieur associé au projet pour les prélèvements sur le lac d'Aiguebelette.

### *2.2.2-Recueil des données sanitaires*

La surveillance téléphonique quotidienne (hors week-end) des volontaires a nécessité le recrutement d'une personne à mi-temps. La personne ayant assuré les appels au cours de

l'étude pilote a continué à les assurer au cours des 9 mois de l'étude finale. La charge de travail a parfois nécessité d'avoir recours à une enquêtrice supplémentaire.

Chaque soir de la semaine l'enquêteur téléphonique contactait 1/5 des familles volontaires de chaque groupe. Chaque famille disposait d'un carnet familial d'auto-enregistrement des différents troubles de santé sur lequel, un membre référent reportait quotidiennement l'état de santé de l'ensemble des membres du foyer. Une même famille n'était jointe par téléphone qu'une seule fois par semaine (toujours le même jour). L'enquêteur téléphonique relevait alors l'ensemble des troubles de santé. Trois indicateurs de morbidité digestive ont été construits à partir des différents signes de morbidité digestive : les troubles digestifs aigus (TDA), i.e., épisodes de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements et/ou de diarrhée ; les épisodes diarrhéiques (ED), i.e., épisodes de diarrhée d'une durée de 2 jours minimum accompagné d'au moins un autre signe digestif (douleurs abdominales, nausées et/ou vomissements) ; Les épisodes hautement probables de gastro-entérite (GE), i.e., diarrhée d'une durée de 2 jours minimum accompagnée d'au moins un autre signe « objectif » (vomissement et/ou fièvre). L'enquêteur relevait particulièrement le nombre de cas incidents de troubles digestifs aigus apparus au cours des dernières 48 h et au cours de la semaine écoulée. Le sondage au 1/5ème tournant assurait une description continue de la morbidité digestive, et le repérage d'éventuels épisodes épidémiques. Un seuil "d'alerte épidémique" avait en effet été défini sur la base des données de l'étude pilote comme étant l'apparition d'au moins 2 cas de TDA dans un même groupe, mais n'appartenant pas à un même foyer, l'annexe 4 présente le calcul du seuil d'alerte.

### **2.3-Enquêtes de consommation d'eau de boisson**

En parallèle de l'enquête principale portant sur les données sanitaires, un questionnaire de consommation d'eau de boisson a été adressé aux volontaires 2 fois au cours de l'étude épidémiologique, afin de produire des estimations individuelles à utiliser pour quantifier l'exposition aux pathogènes. La 1<sup>ère</sup> enquête visait à caractériser leur consommation hivernale (novembre 98 à février 99 inclus); la seconde enquête, leur consommation printanière (mars à juin 99 inclus). Le questionnaire portait sur la consommation d'eau de boisson (sous différentes formes) un jour de semaine et sur la consommation d'un jour du week-end. Se reporter à l'article II : "Description de la consommation d'eau de boisson en France (étude E.MI.R.A)", présenté à la fin du chapitre Résultats.

## **2.4-Surveillance microbiologique de l'eau d'alimentation**

L'objectif du dispositif de surveillance de la qualité de l'eau mise en place dans le cadre de l'étude était double: (1) caractériser de manière répétée cette qualité, en parallèle du suivi épidémiologique, en vue de pouvoir la relier avec l'évolution temporelle de la morbidité, dans un contexte non épidémique; et (2) si une «alerte épidémique » venait à se produire, être en mesure de décrire de manière fine la qualité de l'eau au cours de cet épisode et même juste avant. Ici, après une brève présentation des micro-organismes faisant l'objet de la recherche, sera exposée la procédure générale d'échantillonnage de l'eau, aux fins des analyses. Le protocole détaillé de cette surveillance microbiologique est exposé dans les sections Matériel et Méthode des articles III : "A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (E.MI.R.A study)", présenté en annexe 6; IV : "Implication of waterborne astrovirus in acute digestive conditions (E.MI.R.A study)"; et V : "Assessment of health risks associated with the parasitical quality of drinking water (E.MI.R.A study)", chacun mettant l'accent sur un aspect particulier des techniques analytiques mises en oeuvre. Les articles IV et V sont présentés à la fin du chapitre Résultats.

### *2.4.1-Présentation des micro-organismes viraux et parasitaires faisant l'objet de la recherche*

#### 2.4.1.1-Les virus entériques

##### \*Entérovirus

Les infections à entérovirus (poliovirus, coxsackie-virus A et B, echovirus, entérovirus 68 à 71) sont associés à une très grande diversité clinique, mais le plus souvent elles sont totalement asymptomatiques. Une diarrhée bénigne peut être observée, mais les infections gastro-intestinales ne semblent pas faire partie des pathologies entérovirales majeures. Leur réservoir est exclusivement humain (Nicand, 1998), et leur transmission se fait principalement sur le mode oro-fécal (Pozzeto, 1997). Leur détection dans des échantillons environnementaux est possible par culture cellulaire ou par les techniques de biologie moléculaires. Les entérovirus sont très souvent retrouvés dans les eaux naturelles (Garin, 1994), et ils figurent dans la Directive 76/160/EEC pour le contrôle des eaux récréatives. Ils ont été régulièrement proposés comme indicateurs de contamination virologique de l'eau,

cependant, plusieurs études récentes semblent montrer l'absence de relation avec les virus des gastro-entérites (Gantzer, 1998).

#### \*Rotavirus

Rotavirus est un agent majeur de gastro-entérites aiguës sporadiques chez le jeune enfant (< 24 mois) se produisant principalement au cours de l'hiver, et conduisant souvent à une hospitalisation (50% des enfants hospitalisés pour gastro-entérites pendant la période hivernale) (Glass, 1996; Schwarzbrod, 1991). La transmission se fait par la voie oro-fécale, directe ou indirecte, ou par la contamination de personne à personne (Le Baron, 1990). Le réservoir est humain et animal (Nicand, 1998). La phase d'incubation est brève, de 1 à 3 jours, et les symptômes cliniques (vomissements, fièvre, diarrhée) durent de 5 à 7 jours (Nicand, 1998). Sa détection est particulièrement fastidieuse en routine par culture cellulaire, en revanche les techniques de biologie moléculaires se sont considérablement développées. Rotavirus est caractérisé par une grande variabilité génétique limitant le développement des vaccins, un premier vaccin a cependant été déposé en 1998 aux Etats-Unis ([www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/)).

#### \*Astrovirus

Astrovirus a été décrit pour la première fois en 1975 par microscopie électronique dans les selles d'enfants diarrhéiques (Madeley and Cosgrove, 1975). Il est aujourd'hui reconnu comme une des principales causes de gastro-entérites bénignes chez l'enfant (2 à 8% des cas), mais également dans les autres tranches d'âge, et ce quelque soit le pays (Foley, 2000; Lopez, 2000). La durée d'incubation est brève, de 24 à 36 h. Les symptômes cliniques d'intensité plus faible que ceux liés au rotavirus durent entre 1 et 4 jours (Le Baron, 1990). Sept sérotypes humains d'astrovirus sont confirmés à ce jour (Belliot, 1997 Virus research). Leur détection peut être réalisée par biologie moléculaire (RT-PCR) (Belliot, 1997 Archives Vir) ou par culture cellulaire sur des cellules CaCo-2 (Chapron, 2000). Peu de données sont disponibles sur son devenir dans l'environnement, sa prévalence dans les ressources d'eau potable (Abad, 1997), ainsi que sur les voies de contamination et la transmission par la voie oro-fécale (Belliot, 1997 Virus Research).

#### 2.4.1.2-Les protozoaires

##### *\*Giardia*

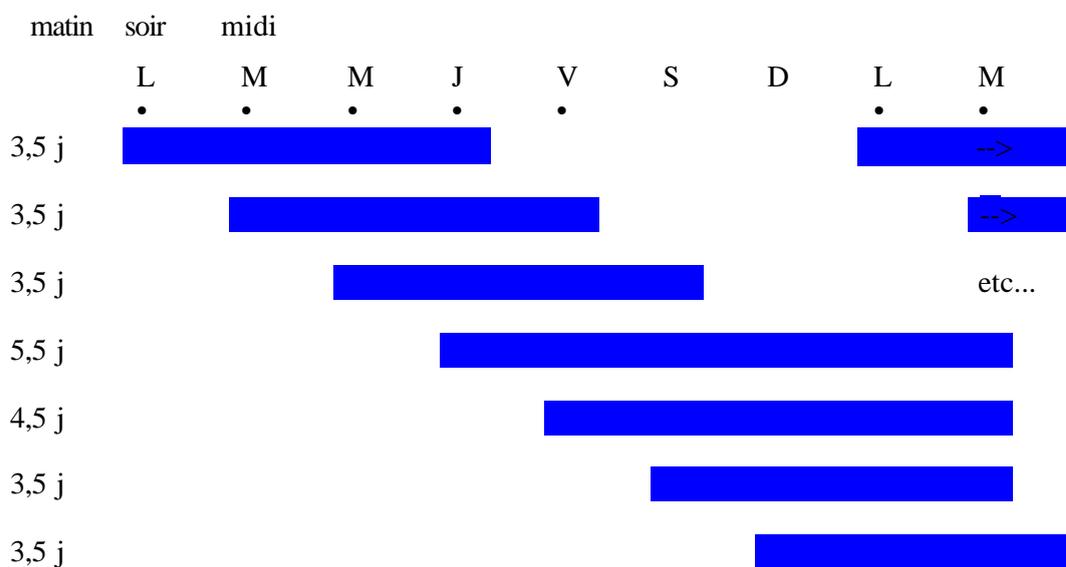
*Giardia* est un parasite (flagellé) qui se présente sous 2 formes : une forme végétative infectieuse (le trophozoïte), et une forme de résistance enkystée sphérique (le cyste) sous laquelle il survit dans l'environnement. Le cycle de *Giardia lamblia* est présenté en annexe 7. Le cyste, qui contient 2 trophozoïtes, mesure de 9 à 13  $\mu\text{m}$ , il est résistant dans l'environnement. L'infection peut être asymptomatique. La Giardiase est une maladie bénigne pour les personnes immunocompétentes, avec des symptômes proches d'une gastro-entérite, les signes sont plus sévères chez les enfants (risque de déshydratation) et les immunodéprimés. Le traitement médicamenteux consiste en l'administration de métrondazole ou de tinidazole. Il a été estimé qu'environ 60% des cas de Giardiase sont d'origine hydrique, et jusque récemment, l'infection par *Giardia* était la pathologie hydrique la plus fréquemment rapportée aux Etats-Unis (Ford, 1999).

##### *\*Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* est un parasite intracellulaire (coccidie), qui se présente également sous 2 formes : la forme végétative infectieuse (sporozoïte), et la forme de résistance enkystée sphérique (oocyste). L'oocyste qui contient 4 sporozoïtes mesure 3 à 6  $\mu\text{m}$ . Il peut survivre plusieurs mois dans l'eau. Le cycle de *Cryptosporidium parvum* est proche de celui de *Giardia*, il comporte cependant une plus grande variété d'hôtes potentiels avec plus de 80 espèces reconnues porteuses de *Cryptosporidium* (animaux d'élevage tels que bovins, ovins, faune sauvage, rongeurs, oiseaux ...). En effet, il n'a pas de spécificité d'hôte ni même d'organe, seulement une localisation préférentiellement intestinale (jéjunum essentiellement). Il s'agit par ailleurs d'un parasite ubiquitaire, présent sur toute la surface du globe, et retrouvé dans différentes catégories d'eaux naturelles (Brasseur, 1998). La Cryptosporidiose affecte essentiellement les individus immunodéprimés ou peu immunocompétents (jeunes enfants, personnes âgées ...) chez qui elle provoque une diarrhée chronique (Milwaukee, Las Vegas) (Mac Kenzie, 1994; Roeffer, 1996). Chez les sujets immunocompétents, l'infection est souvent asymptomatique ou génératrice d'un épisode diarrhéique transitoire. A ce jour il n'existe aucun traitement curatif de cette maladie parasitaire (US-EPA doc 815-R-00-005). Une faible dose est suffisante pour induire des signes cliniques chez l'humain sain. La DMI est de 132 oocystes, et 20% des volontaires du test déclaraient la maladie avec seulement 30 oocystes ingérés (Dupont, 1995).

#### 2.4.2-Recueil des échantillons d'eau

En parallèle de la surveillance épidémiologique, un dispositif de conservation d'échantillons d'eau a été mis en place grâce à la participation d'une sentinelle par commune, rémunérée et équipée à cet effet. La sentinelle conservait au réfrigérateur 4.5 l d'eau, prélevés quotidiennement et conservés de 3.5 à 5.5 jours selon la séquence décrite sur le schéma suivant :



(•) Jours de surveillance épidémiologique (appel téléphonique) et ■ durée de conservation (à +4°C) d'échantillons d'eau (3 x 1,5 l) prélevés en distribution. Note : Les flacons prélevés les jeudis et vendredis matin étaient conservés plus longtemps pour pouvoir analyser l'eau du week-end, si nécessaire.

L'intérêt de ce dispositif réside dans son couplage temporel avec la surveillance épidémiologique. En l'absence d'alerte épidémique, les flacons n'étaient pas analysés et ils étaient donc vidés. En cas de survenue d'alerte épidémique, différents échantillons d'eau conservés au frigo par la sentinelle (celui du jour de la détection "de l'épidémie", celui de la veille, et celui de l'avant-veille) étaient récupérés dès le lendemain matin. Ces échantillons étaient utilisés pour caractériser la qualité virologique de l'eau consommée le jour de l'épisode épidémique présumé et les 2 jours précédents, ce qui inclut les périodes habituelles de latence des troubles infectieux d'origine virale. Valable pour les pathogènes viraux, ce dispositif de conservation ne pouvait pas s'appliquer aux indicateurs bactériens (développement ou inhibition de la flore microbienne) et aux protozoaires (trop grand volume de prélèvement et coût). En cas d'alerte épidémique, la qualité bactériologique de l'eau était donc caractérisée par le prélèvement réalisé par la sentinelle le soir même de l'alerte, et qui était récupéré le lendemain avec les flacons destinés à l'analyse virologique. La qualité parasitologique de l'eau était caractérisée par le prélèvement réalisé au domicile

de la sentinelle le matin du recueil des échantillons destinés à l'analyse virologique et bactériologique.

En complément des analyses dans le cadre d'alertes, des prélèvements ont été réalisés mensuellement hors de tout contexte épidémique, afin de vérifier la qualité habituelle de l'eau dans les diverses communes. Les prélèvements étaient programmés pour le mardi et le mercredi d'une même semaine pour les 7 sites d'étude : le domicile des 4 sentinelles, et les 3 ressources alimentant les groupes 2, 3 et 4. Une campagne de prélèvement durait 11 h en moyenne, auxquelles il faut ajouter les 5 h de transport (entre le CHU de Grenoble, les différents lieux de prélèvement, la Poste, et les laboratoires de bactériologie et de virologie). Des mesures de taux de chlore (libre et total) étaient également réalisées au moment des prélèvements d'eau en distribution afin de vérifier l'efficacité du traitement de désinfection.

Les résultats des campagnes d'analyses microbiologiques conduites au cours de l'étude pilote et de l'étude finale ont laissé penser que l'eau était plus vulnérable au cours du mois de février, particulièrement après d'importantes précipitations. Les outils d'analyses utilisés par les laboratoires partenaires du programme de recherche s'étant affinés au cours des 3 ans du programme de recherche, il nous a donc semblé intéressant de conduire une campagne complémentaire d'analyse microbiologique de l'eau à la suite des pluies annoncées au cours du mois de février 2000. Ce travail visait à augmenter la quantité et la qualité des données disponibles sur la qualité virologique et parasitologique de l'eau en distribution dans la région investiguée, sur 3 années consécutives.

#### *2.4.3-Analyses microbiologiques*

Les analyses microbiologiques ont été réalisées sur les prélèvements collectés lors de la suspicion d'épisodes épidémiques mis en évidence par la surveillance téléphonique, ou dans le cadre des échantillonnages de routine. Les micro-organismes recherchés étaient les virus entériques et les protozoaires présentés en début de chapitre. Les indicateurs bactériens étaient également recherchés pour vérifier la conformité réglementaire de l'eau en distribution. Lors des alertes épidémiques, les analyses ne portaient que sur l'eau de distribution, alors que pour les analyses de routine, elles portaient également - pour les analyses bactériologiques et virologiques - sur l'eau brute dans les réseaux traités (les prélèvements parasitologiques étaient rendus impossibles par les difficultés d'accès à 2 ressources sur 3).

Les échantillons d'eau destinés aux analyses bactériologiques étaient recueillis dans des flacons plastiques stériles de 500 ml à usage unique (contenant du thiosulfate de sodium pour neutraliser le chlore). Les prélèvements étaient réalisés après flambage du robinet en préservant la stérilité des flacons. Les échantillons étaient conservés dans une glacière avant d'être analysés dans un délai inférieur à 24 h. Les analyses étaient réalisées par le service de bactériologie du Laboratoire Régional d'Analyse des Eaux de l'Isère (agrée par le Ministère chargé de la Santé).

Les échantillons d'eau destinés aux analyses virologiques étaient recueillis dans 3 flacons de verres stérilisés de 1.5 l contenant également du thiosulfate de sodium pour neutraliser le chlore. La livraison des flacons de verre aux sentinelles était réalisée mensuellement. Leur stockage et leur stérilisation étaient assurés par le service de bactériologie du CHU de Grenoble. Lors d'une analyse de routine, ou lors d'un épisode épidémique, les échantillons d'eau prélevés et stockés au réfrigérateur par la sentinelle étaient concentrés dans les 24 h au laboratoire de virologie du CHU par ultrafiltration tangentielle (appareil Minitan<sup>TM</sup> de Millipore) (1 h 30 à 2 h de manipulations). Les échantillons ainsi concentrés étaient alors congelés à -80°C en attendant l'analyse par biologie moléculaire. La méthode de concentration par ultra-filtration tangentielle couplée à la détection par RT-PCR a été mise au point pour les poliovirus, les rotavirus et le virus de l'Hépatite A (VHA) (Soule, 1999), par la suite, elle a été développée pour les astrovirus (résultats non publiés). Dans ce travail, le seuil de sensibilité était fixé à 1DICT 50 (dose infectant 50% des cultures cellulaires). La souche témoin des entérovirus était la souche polio Sabin type 1, la souche témoin des rotavirus était la souche bovine RFC 67, la souche témoin des astrovirus était la souche HAstV 1. La technique mise en œuvre ne permettant pas encore une quantification systématique, les résultats sont donnés sous la forme semi-quantitative suivante : <SD, +, ++. Le séquençage des ARN de rotavirus pour certains prélèvements a été réalisé par la société Iséroise Genom express. Le séquençage des astrovirus n'a pas pu être conduit par manque de matériel génétique.

Les échantillons d'eau destinés aux analyses parasitologiques étaient prélevés à l'aide d'un compteur volumétrique et concentrés directement sur une cartouche de filtration en polyéthersulfone, de porosité 1 µm (Envirocheck, Gelman® Sciences inc, MI, USA), fournie par Anjou-Recherche (Laboratoire Central de la Générale des Eaux, Vivendi Waters). Les

cartouches Envirocheck sont destinées à la détection des kystes des protozoaires *Giardia* et *Cryptosporidium*. Le débit de prélèvement à respecter était de 2 l par minute, soit une heure de prélèvement pour 100 l d'eau filtrés. Les cartouches étaient stockées dans une glacière et envoyées dans la journée par chronopost dans une boîte isotherme (+4°C) pour être analysées dès réception au Laboratoire Central. L'identification et le dénombrement de ces protozoaires a été effectué selon le protocole "traiteur d'eau" (protocole de détection standard issu de la méthode US-EPA 1622 et élaboré en 1996 par plusieurs centres de recherche financés par les traiters d'eau). La méthode de détection peut être résumée comme suit : concentration par filtration sur cartouche Envirocheck, élution de la cartouche, réduction du volume par centrifugation, purification de l'éluat par flottation à travers un gradient de Percoll-Sucrose, lavage, tri par cytométrie, enfin, identification par marquage des parasites grâce à des anticorps anti-*Giardia* et anti-*Cryptosporidium*, et dénombrement à l'aide d'un microscope à Epifluorescence. Pour tous les échantillons, excepté ceux prélevés en avril et en juin 1999 (volume analysé = 50%), 10% du volume du culot ont été analysés. Notre choix s'est porté sur les cartouches Envirocheck car elles permettent d'obtenir de façon reproductible de bons rendements (Cervantez, 1997), elles se colmatent peu, sont faciles d'utilisation et permettent un gain de temps substantiel (Matheson, 1998; Stanfield, 2000). D'ailleurs, ces cartouches sont désormais utilisées aux Etats-Unis dans le cadre de la nouvelle réglementation (méthode US-EPA 1622, 1623).

Anjou-Recherche ayant mis au point en cours d'année un protocole plus performant d'analyse des kystes de protozoaires, il nous est apparu intéressant d'en faire bénéficier nos échantillons prélevés sur le terrain (le rendement de la nouvelle technique serait approximativement de 70% contre 50% pour la technique « standard »). Le nouveau protocole est basé sur une technique de purification des kystes par Immuno-Magnétique Séparation (IMS), plus performante que la technique de séparation par flottation, et sur une technique de détection assistée par ordinateur, facilitant grandement la lecture microscopique (le Chemsan) (Zanelli, 2000). Le protocole IMS anti-*Giardia* et anti-*Crypto* reprend les étapes de filtration, élution et concentration de l'échantillon. L'étape de purification comprend une 1<sup>ère</sup> étape de capture des kystes par des billes métalliques spécifiques, puis une 2<sup>ème</sup> étape de dissociation du complexe kystes-billes. L'échantillon est alors filtré sur une membrane Chemunex de porosité 2µm, et les kystes fixés sur la membrane sont marqués par des AC anti-*Giardia* et anti-*Crypto*. La détection des kystes se fait par immunofluorescence grâce au Chemsan : l'appareil balaye très rapidement l'ensemble de la membrane (en 3

minutes), et à chaque excitation du fluorochrome, il repère la position de l'événement qu'il fait apparaître sur un écran d'ordinateur. La confirmation des événements se fait par un examen microscopique de la membrane, sachant que l'ordinateur place lui-même le microscope sur les événements détectés. La lecture microscopique d'une membrane ne dure plus que 10 à 30 minutes avec le Chemsan contre 1 à 4 heures en lecture visuelle simple. Malheureusement, tous les échantillons n'ont pu bénéficier de cette seconde analyse (échantillons non conservés, ou problèmes de conservation). Seuls 6 échantillons ont pu faire l'objet d'une ré-analyse par IMS-Chemsan. Il est important de rappeler qu'aucune des 2 méthodes de détection utilisées ne fournit d'indication sur la viabilité et l'infectivité des kystes de protozoaires détectés.

## **2.5-Analyse statistique des données**

Afin d'exploiter au mieux les données et envisager les meilleurs outils d'analyse, des avis extérieurs ont été régulièrement sollicités (séminaire de recherche à Bâle en octobre 1999, avec le soutien de biostatisticiens tels que J. Schwartz et A. Pope; appel à des statisticiens grenoblois tels que G. Daubigny, pour orienter l'analyse des données). Nous avons également eu recours à un jeune chercheur en biostatistiques pour l'analyse des données longitudinales.

La 1<sup>ère</sup> phase de l'analyse statistique consistait à identifier la meilleure voie de traitement adaptée aux données. Pour cela, la distribution et les paramètres des différentes variables (caractéristiques de la population, variables d'effet, et variables d'exposition) ont été décrites. La 2<sup>ème</sup> phase de l'analyse s'est attachée à trouver la meilleure modélisation mathématique de la relation dose-réponse entre chacun des 5 micro-organismes étudiés, et les effets sanitaires observés dans la population. L'analyse a porté sur l'ensemble des 544 personnes caractérisées par 224 observations sanitaires (les 32 semaines de suivi), et ce, pour les 3 indicateurs de morbidité digestive construits à partir des données sanitaires recueillies (TDA, ED et GE) (annexe 9 : plan d'analyse de David D). L'exposition des individus a fait l'objet de plusieurs approches :

- \* estimation individuelle ou stratifiée (par commune, par classe d'âge);
- \* attribution des mesures de concentration à une période, centrée sur le prélèvement, plus ou moins longue (+/-14 j, +/-7 j, +/-3j), sachant que les prévalences microbiennes sont des

estimations quantitatives pour les protozoaires, et des estimations semi-quantitatives pour les virus;

\* estimation individuelle ou groupée des consommations d'eau du robinet;

\* prise en compte des consommations hors de la commune.

Comme dans de nombreuses études de suivi épidémiologique prospectif impliquant une analyse longitudinale, la méthode GEE (Generalized Estimating Equations) a été choisie pour prendre en compte le caractère répété des observations, avec une fonction de lien de type régression logistique en raison de la réponse discrète (absence/présence de troubles digestifs) pour ajuster sur les facteurs de confusion potentiels, ou étudier des interactions. L'équation mathématique qui fournit la probabilité de TDA en fonction de différentes variables  $X_i$  est la suivante:

1

$$P(\text{TDA}) = \frac{1}{1 + \exp(-[\alpha + \sum \beta_i X_i])} \quad \text{où } \alpha \text{ et } \beta_i \text{ sont les paramètres du modèle GEE final}$$

L'analyse finale a été réalisée sur les données individuelles de TDA centrées sur +/- 3 jours autour des prélèvements microbiologiques. Elle a pris en compte les consommations individuelles d'eau de robinet. L'exposition des 444 volontaires des groupes 0, 1 et 3 a été caractérisée par les mesures de 9 prélèvements (8 campagnes de routine, 1 alerte épidémique); celle des 100 volontaires du groupe 2 par les mesures de 8 prélèvements, car l'épisode épidémique a été concomitant à la campagne de routine. L'analyse finale a donc porté sur 225 TDA (712 recueillis) et 33 572 personnes-jour (sur 92 186 observés). La semaine de référence correspond à la 1<sup>ère</sup> semaine de prélèvement (début novembre 1998); les semaines qui suivent sont toutes les autres semaines au cours desquelles des prélèvements ont été réalisés (fin novembre, début décembre, fin décembre, mi janvier, fin janvier, mi février, mi mars, fin avril, mi mai, fin mai et mi juin). La commune de référence au cours de l'analyse est la commune alimentée par une eau souterraine non traitée (groupe 0). La classe d'âge de référence est le groupe des 0-4 ans. Le sexe masculin a été choisi comme référence. La maison est l'habitat de référence par opposition à l'appartement.

Différents modèles GLM (Generalized Linear Models) et GEE ont finalement été développés. Le critère d'Akaike, la déviance et le Likelihood Ratio Test ont permis de sélectionner le modèle GEE à matrice d'auto-corrélation indépendante parmi les modèles

qu'il a été possible de tester (la matrice de corrélation auto régressive d'ordre M, a priori pertinente pour nos données, n'a pas pu être traitée, car non disponible avec le logiciel utilisé). Pour la sélection des variables de confusion potentielles avec une bonne sensibilité, le niveau de  $p$  a été fixé à 25% dans un 1<sup>er</sup> temps, à 15% dans un 2<sup>ème</sup> temps. Certaines variables ont été "forcées" dans les modèles quelle que soit leur association au risque (commune, âge des sujets). L'effet conjoint des divers micro-organismes a été étudié, ainsi que la notion de dose, en combinant la concentration des germes et l'estimation de la quantité d'eau du robinet ingérée. Cette combinaison a permis d'étudier la relation dose-réponse pour *Giardia*. Ce modèle a pu être comparé au modèle exponentiel établi par expérimentation clinique sur volontaires sains, il y a bientôt 50 ans par Rendtorff (1954), et encore utilisé par les évaluateurs du risque, à la fois dans le cadre de recherches et dans celui de l'élaboration de textes réglementaires. En effet, l'excès de risque de trouble digestif associé à l'ingestion de kystes de *Giardia* a été calculé à partir du modèle GEE final construit sur les données, puis comparé à celui calculé à l'aide des paramètres de la fonction dose réponse exponentielle. Différentes hypothèses ont été testées sur un facteur de pondération combinant la variabilité et les incertitudes relatives au rendement de la technique de détection, à la viabilité des kystes détectés, à leur caractère infectieux pour l'homme, et enfin à leur virulence (i.e., leur capacité après avoir induit une infection à conduire à des manifestations cliniques). La méthode est développée dans l'article VI : Waterborne microbial risk assessment : epidemiological construction of a dose-response function of *Giardia* (E.M.I.R.A study), présenté à la fin de la section Résultats.

## **3-RESULTATS**

### **3.1-La population d'étude**

Entre septembre et novembre 1998, 4696 foyers ont été directement sollicités pour participer à l'étude. Les personnes intéressées se sont manifestées en renvoyant le coupon réponse joint à chaque courrier, ou en téléphonant directement au laboratoire pour se faire envoyer les fiches d'inclusion. Deux cent onze foyers nous ont retourné un bulletin de participation, soit un taux de réponse de 4.5%. Vingt sept foyers volontaires n'étaient pas éligibles pour l'enquête, essentiellement du fait de la non consommation d'eau du robinet. Lorsqu'un foyer était inclus, tous les membres de ce foyer faisaient l'objet de la surveillance épidémiologique. Le recrutement des volontaires dans les communes ayant déjà participé à l'étude pilote a été relativement aisé. Il fut cependant nécessaire de compléter le recrutement dans le groupe 2 (la principale difficulté étant la petite taille de la commune). Dans le groupe 1, 8 foyers volontaires sur les 22 de l'étude pilote se sont engagés à nouveau pour l'étude finale. Dans le groupe 2, ce sont 20 foyers sur 57 qui se sont réengagés (soit plus de 35 % dans les 2 cas). Le recrutement dans le groupe alimenté par le lac (groupe 4) a été aisé, sans doute facilité par la sensibilité de la population locale aux problèmes de "pollutions" pré-existants sur le lac. En revanche, le recrutement dans le groupe 3 a été plus laborieux, nécessitant de solliciter à plusieurs reprises les habitants, et ce par divers moyens. La petite taille de la population alimentée par la source Silien (321 foyers), et la proportion importante de personnes ne consommant que de l'eau embouteillée explique en grande partie ces difficultés.

La surveillance épidémiologique par téléphone, qui a débuté le 26 octobre 1998 pour le 4ème groupe, et le 16 novembre pour les 3 autres groupes, devait porter sur 184 familles. Dans les toutes premières semaines d'enquête, 7 familles ont renoncé à l'étude, essentiellement pour des questions de disponibilités ou pour l'aspect "contraignant" du recueil. Seule une famille a renoncé par lassitude en milieu d'étude. Le nombre de volontaires suivi jusqu'au 18 juin 1999 (212 jours au total) s'élève donc à 544 sujets, [27.5% de 0-14 ans], répartis dans 176 foyers : 40 foyers (122 personnes) dans le groupe 1, 32 foyer (100 personnes) dans le groupe 2, 36 foyers (100 personnes) dans le groupe 3, et 68 foyers (222 personnes) dans le groupe 4.

La structure de la population d'étude, par sexe, âge et Catégorie Socio-Professionnelle (CSP), a été comparée à celle de la population générale des communes sélectionnées pour l'étude ; elle est présentée dans le tableau II.

*Tableau II : Comparaison des caractères socio-démographiques de l'ensemble de la population d'étude par rapport à la population générale*

|  | <b>Population d'étude</b><br>(n=534) | <b>Population générale *</b><br>(n=34 275) | <b>p value</b> |
|--|--------------------------------------|--|----------------|
| <b>Sexe ratio</b>                      | 0.96                                 | 0.98                                       | 0.9            |
| <b>Classe d'âge</b>                    | (en %)                               | (en %)                                     |                |
| 0-4 ans                                | 6.9                                  | 5.6  | 0.2            |
| 5-14 ans                               | 20.6                                 | 14.1                                       | <<0.001        |
| 15-59 ans                              | 60.4                                 | 59.5                                       | 0.7            |
| > 60 ans                               | 12.1                                 | 20.9                                       | <<0.001        |
| <b>CSP de la personne de référence</b> | (en %)<br>(n=170)                    | (en %)<br>(n=13 176)                       |                |
| Agric. Exploit.                        | 1.2                                  | 2.7  | 0.3            |
| Artis. Commerc.                        | 10.6                                 | 8.7  | 0.4            |
| Cadre prof int sup.                    | 12.9                                 | 8.2  | 0.02           |
| Prof. Intermed.                        | 20.6                                 | 12.8                                       | 0.002          |
| Employé                                | 20.6                                 | 7.9  | <<0.001        |
| Ouvrier                                | 5.9                                  | 23.2                                       | <<0.001        |
| Retraité                               | 24.1                                 | 32.1                                       | 0.03           |
| autres                                 | 4.1                                  | 4.4  | 0.9            |

\* *Source : INSEE Rhône-Alpes*

La population de volontaires n'est pas parfaitement représentative de la population générale dont elle est issue. Les enfants de 5 à 14 ans y sont plus représentés, aux dépens de la tranche d'âge des plus de 60 ans. Le mode de recrutement justifie ce déséquilibre, puisque via les écoles primaires nous avons ciblé les familles avec enfants d'âge scolaire. Les ouvriers sont très peu représentés, à l'opposé des cadres, des professions intermédiaires, et des employés, phénomène courant dans des études procédant par appel à volontaires. Malgré leur proximité géographique, les populations générales des communes d'étude présentent une

structure, par sexe, âge et CSP, différente. Nous observons également des différences notables au sein d'une même commune entre la population de volontaires et la population générale correspondante. Le sexe ratio diffère légèrement, dans un sens ou dans l'autre, selon le groupe considéré. La part des 15-59 ans est comparable pour les 4 communes, en revanche les 0-4 ans sont sur-représentés dans le groupe 1, aux dépens des plus de 60 ans; les 5-14 ans sont sur-représentés dans le groupe 3, ainsi que dans le groupe 4, également aux dépens des plus de 60 ans. Les professions intermédiaires et les employés sont sur-représentés dans les 4 groupes aux dépens des ouvriers. Les cadres et professions intellectuelles ne sont sur-représentés que dans les groupes 1 et 2. Les retraités sont sous-représentés dans les groupes 1 et 4 (tableau II bis).

Tableau II bis : Structure socio-démographique de la population d'étude par commune, par rapport à la population générale correspondante \*

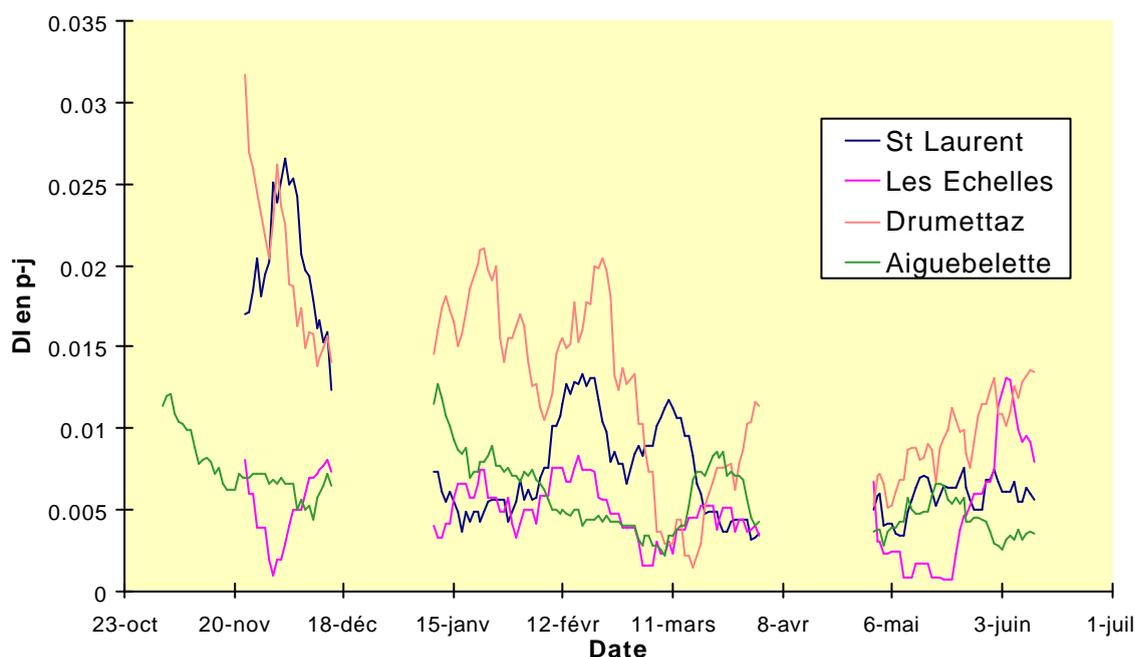
|  | Groupe 1         |                   | Groupe 2         |                   | Groupe 3         |                    | 4 <sup>ème</sup> groupe |                   |
|--|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
|  | Observé<br>n=116 | Général<br>n=9820 | Observé<br>n=100 | Général<br>n=4193 | Observé<br>n=100 | Général<br>n=13043 | Observé<br>n=222        | Général<br>n=7219 |
| <b>Sexe ratio</b>                          | 1.04             | 0.99              | 0.79             | 0.99              | 0.87             | 0.96               | 1.05                    | 0.98              |
| <b>Classe d'âge</b>                        | (en %)           | (en %)            | (en %)           | (en %)            | (en %)           | (en %)             | (en %)                  | (en %)            |
| 0-4 ans                                    | 11.2             | 5.0               | 4                | 5.6               | 4                | 6.3                | 7.2                     | 5.2               |
| 5-14 ans                                   | 16.4             | 13.1              | 16               | 13.5              | 22               | 14.9               | 24.3                    | 14.6              |
| 15-59 ans                                  | 64.7             | 58.4              | 59               | 59.8              | 61               | 61.8               | 58.6                    | 57.2              |
| > 60 ans                                   | 7.8              | 23.5              | 21               | 22.9              | 13               | 17.1               | 9.9                     | 22.9              |
| <b>CSP de la personne<br/>de référence</b> | n=39<br>(en %)   | n=3332<br>(en %)  | n=32<br>(en %)   | n=1560<br>(en %)  | n=32<br>(en %)   | n=4708<br>(en %)   | n=67<br>(en %)          | n=2692<br>(en %)  |
| Agric. Exploit.                            | 5.1              | 2.0               | 0                | 6.9               | 0                | 0.8                | 1.5                     | 4.0               |
| Artis. Commer.                             | 5.1              | 8.4               | 9.4              | 11.3              | 9.4              | 8.8                | 13.4                    | 7.7               |
| Cadre prof sup.                            | 20.5             | 6.5               | 9.4              | 3.6               | 12.5             | 12.1               | 7.5                     | 6.6               |
| Prof. Intermed.                            | 18               | 11.5              | 15.6             | 9.2               | 25               | 17.5               | 19.4                    | 9.5               |
| Employé                                    | 15.4             | 6.3               | 15.6             | 7.7               | 18.8             | 9.4                | 26.9                    | 6.1               |
| Ouvrier                                    | 10.3             | 24.0              | 5                | 23.6              | 6.3              | 20.0               | 3.0                     | 26.6              |
| Retraité                                   | 10.3             | 40.6              | 27               | 35.1              | 28.1             | 26.3               | 23.9                    | 35.8              |
| autres                                     | 15.4             | 3.1               | 5                | 2.6               | 0                | 5.2                | 3.0                     | 3.9               |

\* Source : INSEE Rhône-Alpes

### 3.2-La surveillance épidémiologique

Le graphe 1 décrit l'évolution de l'incidence journalière des troubles digestifs aigus (TDA) observée dans les 4 groupes au cours de l'étude finale. Le graphe 2 présente l'évolution des données météorologiques (précipitations et température) dans le même intervalle de temps. Nous pouvons observer une certaine correspondance, avec décalage dans le temps, entre les pics de précipitations et les augmentations du signal sanitaire. Le «bruit de fond » de TDA observé au cours de l'étude était en moyenne de 2,8 cas par personne-an. La définition des TDA englobe un nombre de cas plus grand que la définition plus stricte des gastro-entérites (GE). Le bruit de fond des GE, observé au cours de l'étude a été estimé à 0.2 cas par personne-an (tableaux III). Les définitions des indicateurs de morbidité digestive (TDA, ED et GE) sont rappelées en bas du tableau III.

*Graphe 1 : Evolution de l'incidence (en Densité d'Incidence, moyenne mobile t=15 j) dans les 4 groupes d'étude, entre le 16 octobre 1998 et le 18 juin 1999*



*Note : les interruptions des graphes correspondent aux vacances scolaires*

Il apparaît que la densité d'incidence des TDA et des ED diffère entre les 4 groupes de communes (la p value est respectivement  $\ll 0.0001$ , et  $0.0018$ ); pour ce qui est des GE, le faible nombre d'épisode ne permet pas d'observer une différence statistiquement significative ( $p=0.16$ ).

Grappe 2 : Evolution des données météorologiques, précipitations et températures, par décades, entre octobre 1998 et juin 1999

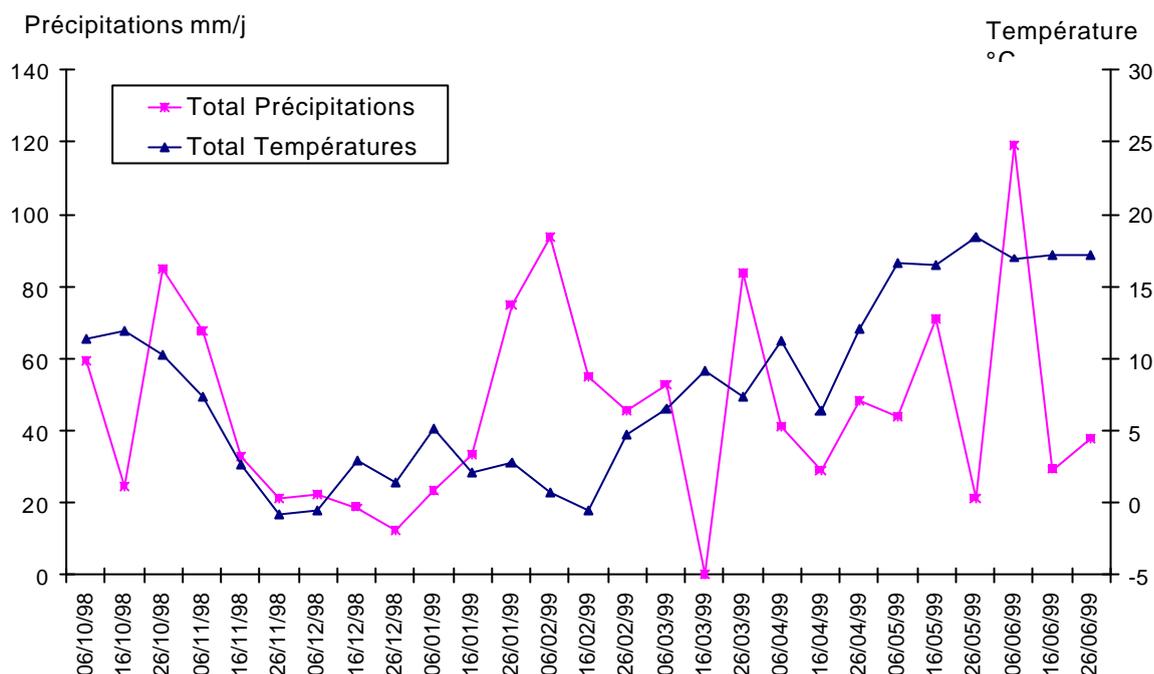


Tableau III : Incidence (I) et densité d'incidence (DI) en personne-an des différents troubles digestifs aigus (TDA), des épisodes diarrhéiques (ED), et des gastro-entérites (GE) pour les 4 populations suivies pendant 212 jours (16/10/98 @ 18/06/99).

|                          | Taille de la population | Troubles digestifs aigus (TDA) |               | Episodes diarrhéiques (ED) |               | Gastro-entérites (GE) |               |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------|----------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
|                          |                         | I                              | DI [IC95%]    | I                          | DI [IC95%]    | I                     | DI [IC95%]    |
|                          |                         |                                |               |                            |               |                       |               |
| Groupe 1<br>p-j = 19 391 | 122                     | 167                            | 3.1 [2.7-3.6] | 26                         | 0.5 [0.3-0.7] | 14                    | 0.3 [0.1-0.4] |
| Groupe 2<br>p-j = 15 004 | 100                     | 83                             | 2.0 [1.6-2.5] | 14                         | 0.3 [0.2-0.5] | 9                     | 0.2 [0.1-0.4] |
| Groupe 3<br>p-j = 14 961 | 100                     | 191                            | 4.7 [4.0-5.3] | 30                         | 0.7 [0.5-1.0] | 9                     | 0.2 [0.1-0.4] |
| Groupe 4<br>p-j = 42 830 | 224                     | 271                            | 2.3 [2.0-2.6] | 35                         | 0.3 [0.2-0.4] | 14                    | 0.1 [0.1-0.2] |
| Total<br>p-j = 92 186    | 544                     | 712                            | 2.8 [2.6-3.0] | 105                        | 0.4 [0.3-0.5] | 46                    | 0.2 [0.1-0.2] |

\* TDA = troubles digestifs aigus, ie épisodes de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements et/ou de diarrhée.

ED = épisodes diarrhéiques : épisodes de diarrhée d'une durée de 2 jours minimum accompagné d'au moins un autre signe digestif (douleurs abdominales, nausées et/ou vomissements).

GE = épisodes hautement probables de gastro-entérite : diarrhée d'une durée de 2 jours minimum accompagnée d'au moins un autre signe « objectif » (vomissement et/ou fièvre).

Le suivi épidémiologique a également permis de préciser la proportion de personnes affectées par un épisode de morbidité digestive qui avaient alors recours à la prise de médicaments, à une consultation médicale, ou qui renonçaient à se rendre à leur travail, ou à l'école (tableau III bis).

*Tableau IIIbis : Proportion d'épisodes de TDA, ED et GE ayant conduit à la prise de médicaments, à une consultation médicale et/ou à un arrêt de travail ou d'école*

|                       | <b>TDA</b> | <b>ED</b> | <b>GE</b> |
|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| Nombre d'épisodes     | 712        | 105       | 46        |
| Prise de médicaments  | 41%        | 67%       | 94%       |
| Consultation médicale | 17%        | 31%       | 59%       |
| Absentéisme           | 6%         | 11%       | 48%       |

Les données de morbidité digestive et de surveillance microbiologique de l'eau de boisson relatives au seul épisode épidémique confirmé au cours de l'étude (février 1999, dans le groupe 3) sont présentées dans la section Résultats de l'article III : "A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (E.MI.R.A study)" en annexe 6.

### **3.3-Les enquête de consommation d'eau de boisson**

La consommation journalière d'eau de boisson des 544 volontaires de l'étude, appréciée par questionnaire à deux reprises au cours du suivi longitudinal de 9 mois, est détaillée dans l'article II : "Description de la consommation d'eau de boisson en France à l'usage des épidémiologistes et évaluateurs du risque" qui est regroupé, avec trois autres articles, à la fin de ce chapitre. En substance, les résultats diffèrent selon la saison d'enquête. L'utilisation d'eau du robinet pour divers usages alimentaires suit une distribution normale (moyenne arithmétique hiver = 1.55 l/j (IC 95%, [0.20-2.90]); moyenne arithmétique printemps = 1.78 l/j (IC95%, [0.13-3.43]). La consommation d'eau de boisson totale suit une distribution log normale (moyenne géométrique hiver = 1.60 l/j, écart type = 1.73 l/j; moyenne géométrique printemps = 1.92 l/j, écart type = 1.70). L'eau du robinet représente plus de 80% de la consommation totale d'eau de boisson, dans cette population d'étude, l'eau du robinet consommée sans aucune modification représentant 42% de l'eau de boisson totale. Les

résultats sont également présentés par classe d'âge, et comparés aux valeurs de consommation d'eau disponibles dans la littérature.

### **3.4-La surveillance microbiologique**

Huit campagnes de prélèvements ont été réalisées en routine entre novembre 1998 et juin 1999; 4 alertes épidémiques ont été déclenchées, une dans chaque groupe d'étude. Les échantillons d'eau prélevés en distribution dans chaque groupe ont été analysés en bactériologie, virologie et parasitologie. Les échantillons prélevés en ressource dans les réseaux traités ont été analysés en bactériologie et virologie uniquement.

#### *3.4.1-Résultats bactériologiques*

Les 3 groupes de l'étude alimentés par une eau traitée répondaient aux critères d'inclusion de l'étude. En revanche, la commune délivrant une eau non traitée, choisie initialement comme référence, s'est révélée en cours d'étude non conforme aux critères d'inclusion. Les analyses bactériologiques réalisées sur les 3 ressources d'eau brute, au cours des 8 campagnes de routine, ont toujours montré une grande vulnérabilité (contamination des 3 ressources par des germes-tests dans 100% des cas), rendant l'eau impropre à la consommation sans un traitement de désinfection. Les analyses réalisées en distribution montrent qu'alors que le groupe "eau non traitée" (groupe 1) a été inclus sur la base de 100 % de conformité des analyses bactériologiques en distribution, 22 % de non conformité ont été observées. Pour les communes du groupe "eau traitée", le groupe 2 présente 22 % de non conformité, les groupes 3 et 4 : 11% (tableau IV). Seul le groupe 3 a montré un niveau de contamination bactériologique ponctuellement véritablement élevé (campagne 6). Il est à noter qu'à l'occasion de l'épidémie avérée dans le groupe 3, en février 1999, l'eau en distribution est restée conforme aux critères réglementaires, alors même que des pathogènes viraux et parasitaires ont été retrouvés.

Tableau IV : Résultats bactériologiques de l'eau en distribution (sur 500 ml) \*

|                         | Groupe 1                   | Groupe 2                          | Groupe 3   | Groupe 4                                      |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|---|
| Campagne 1 (nov)        | Eau conforme               | Eau NON conforme<br>(1 C et 1 CT) | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 2(dec)         | Eau conforme               | Eau conforme                      | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 3 (jan)        | Eau conforme               | Eau conforme                      | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 4 (fev)        | Eau conforme               | Eau conforme                      | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 5 (mar)        | Eau NON<br>conforme (2 SR) | Eau conforme                      | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 6 (avr)        | Eau conforme               | Eau conforme                      | Eau NON<br>conforme (95 C,<br>90 CT, et 102 SF ) | Eau conforme                                  |
| Campagne 7 (mai)        | Eau conforme               | Eau NON conforme<br>(1 C et 1 CT) | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| Campagne 8 (juin)       | Eau NON<br>conforme (1 SF) | Eau conforme                      | Eau conforme                                     | Eau conforme                                  |
| <i>Epidémie 1 (nov)</i> | <i>Eau conforme</i>        | /                                 | /  | /   |
| <i>Epidémie 2 (dec)</i> | /                          | /                                 | /  | <i>Eau NON<br/>conforme (1 C<br/>et 1 CT)</i> |
| <i>Epidémie 3 (fev)</i> | /                          | /                                 | <i>Eau conforme</i>                              | /   |
| <i>Epidémie 4 (mai)</i> | /                          | <i>Eau conforme</i>               | /  | /   |

\* C=coliforme, CT=coliforme thermotolérant, SF=streptocoques fécaux, SR=spores de bactéries sulfito-réductrices

### 3.4.2-Résultats virologiques

Les principaux résultats de la qualité virologique de l'eau sont présentés dans l'article III : "A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (E.MI.R.A study)" en annexe 6; et dans l'article IV : "Implication of waterborne astrovirus in acute digestive conditions (E.MI.R.A study)" placé à la suite de ce chapitre.

Les ARN des virus entériques étudiés ont été régulièrement retrouvés dans les échantillons d'eau (ressource et distribution) prélevés. Trente huit pourcent (9/24) des échantillons d'eau brute, et 23% (10/44) des échantillons d'eau du robinet étaient positifs pour au moins un

ARN de virus. Neuf échantillons d'eau du robinet positifs sur 10 étaient conformes aux critères bactériologiques réglementaires. Aucun ARN de virus entérique n'a été détecté dans le groupe 1, qui était occasionnellement contaminé par des germes tests de contamination fécale. Dans les 3 autres groupes, la proportion d'échantillons positifs est respectivement de 11%, 37% et 53 %. Enterovirus, rotavirus et astrovirus ont été retrouvés respectivement dans 13%, 15% et 12% des échantillons (ressource et eau du robinet confondues). Le tableau V présente les résultats virologiques par commune, en ressource (colonne de gauche), et dans l'eau du robinet (colonne de droite). La ressource du groupe 2 était rarement contaminée par des ARN viraux, alors que celles des groupes 3 et 4 l'étaient plus souvent - (respectivement 2/8 et 6/8). Pour ce qui est de l'eau du robinet, le groupe 1 n'a montré aucune contamination virale ; le groupe 2 - comme l'indiquait les analyses en ressource - était rarement contaminé ; le groupe 3 a présenté une forte contamination par des ARN viraux entre février et mars 1999 ; enfin, le groupe 4 - dont la ressource était très souvent contaminée par des ARN d'astrovirus - a présenté régulièrement une contamination de l'eau du robinet par des entérovirus (mais, étonnamment, peu par des astrovirus).

#### *3.4.3-Investigations complémentaires de l'épidémie de février 1999 dans le groupe 3, avec séquençage des ARN de rotavirus détectés*

En Février 1999, une épidémie de troubles digestifs a été détectée dans la population du groupe 3. Des ARN d'entérovirus, de rotavirus et d'astrovirus ont été détectés dans les échantillons d'eau du robinet prélevés et stockés par la sentinelle au cours de cet épisode, alors qu'aucun germe test de contamination fécale n'a été retrouvé. *Giardia* a également été retrouvé dans un échantillon (10 cystes dans 100 l). Les investigations en biologie moléculaire n'ont pas porté sur les ARN d'entérovirus qui ne sont pas considérés dans la littérature comme directement impliqués dans les troubles digestifs associés à la consommation d'eau de boisson. Elles n'ont pas porté non plus sur les ARN d'astrovirus, par manque de matériel génétique suffisant. En revanche, le séquençage a pu être réalisé pour identifier l'origine (animale ou humaine) des fragments amplifiés de rotavirus (figure 1). Deux souches bovines ont alors été retrouvées (tableau VI).

Tableau V : Résultats virologiques en ressource et distribution dans les 4 groupes d'étude entre novembre 1998 et juin 1999

|                  | Virus    | Groupe 1     |           | Groupe 2 |           | Groupe 3 |           | Groupe 4 |   |
|------------------|----------|--------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|---|
|                  |          | (non traité) | ressource | robinet  | ressource | robinet  | ressource | robinet  |   |
| <b>Routine 1</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | +        | < |
| <b>Routine 2</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | +         | <        | <         | <        | + |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | +         | <        | <         | <        | + |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | +        | < |
| <b>Routine 3</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
| <b>Routine 4</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | + |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | +         | +        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | +         | +        | +         | <        | < |
| <b>Routine 5</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | +        | <         | <        | < |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | <         | +        | +         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | +         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
| <b>Routine 6</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | + |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | +        | < |
| <b>Routine 7</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | + |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | +        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | +        | < |
| <b>Routine 8</b> | <i>E</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>R</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
|                  | <i>A</i> | <            | <         | <        | <         | <        | <         | <        | < |
| <b>Alerte 1</b>  | <i>E</i> | <            |           | /        |           | /        |           |          | / |
|                  | <i>R</i> | <            |           |          |           |          |           |          |   |
|                  | <i>A</i> | <            |           |          |           |          |           |          |   |
| <b>Alerte 2</b>  | <i>E</i> | /            |           | /        |           | /        |           |          | < |
|                  | <i>R</i> |              |           |          |           |          |           |          | < |
|                  | <i>A</i> |              |           |          |           |          |           |          | < |
| <b>Alerte 3*</b> | <i>E</i> | /            |           | /        |           | +        |           |          | / |
|                  | <i>R</i> |              |           |          |           | +        |           |          |   |
|                  | <i>A</i> |              |           |          |           | <        |           |          |   |
| <b>Alerte 4</b>  | <i>E</i> | /            |           | <        |           | /        |           |          | / |
|                  | <i>R</i> |              |           | <        |           |          |           |          |   |
|                  | <i>A</i> |              |           | <        |           |          |           |          |   |

*E* : Enterovirus; *R* : Rotavirus; *A* : Astrovirus

< : inférieur au seuil de détection (1 TCID 50 L-1)

+ : présence d'ARN viral.

\* Cette alerte est la seule correspondant à une véritable épidémie

Tableau VI : Résultats du séquençage des rotavirus détectés pendant et après l'épidémie, groupe 3

| Date (numéro d'échantillon) | RT-PCR n°1  | RT-PCR n°2         | Résultats du séquençage |    |    |    |    |    |    |    |     |     |  |
|-----------------------------|-------------|--------------------|-------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|--|
|                             |             |                    | AA 21                   | 26 | 39 | 41 | 45 | 47 | 69 | 86 | 103 | 104 |  |
| 17/02 * (33)                | Non détecté | +                  | Manque de matériel      |    |    |    |    |    |    |    |     |     |  |
| 17/02 ** (34)               | +           | Non détecté        | I                       | M  | V  | T  | A  | T  | N  | V  | Q   | L   |  |
| 18/02 *** (35)              | Non détecté | +                  | I                       | T  | V  | T  | A  | T  | N  | V  |     |     |  |
| 19/02 **** (36)             | +           | Manque de matériel | Manque de matériel      |    |    |    |    |    |    |    |     |     |  |
| 20/02 **** (37)             | +           | +                  | M                       | T  | I  | V  | T  | I  | D  | V  | Q   | L   |  |
| 17/03 ***** (43)            | +           | +                  | M                       | T  | I  | V  | T  | I  | D  | V  | Q   | L   |  |

\* Echantillon eau du robinet en routine, Février (*Giardia* a également été retrouvé)

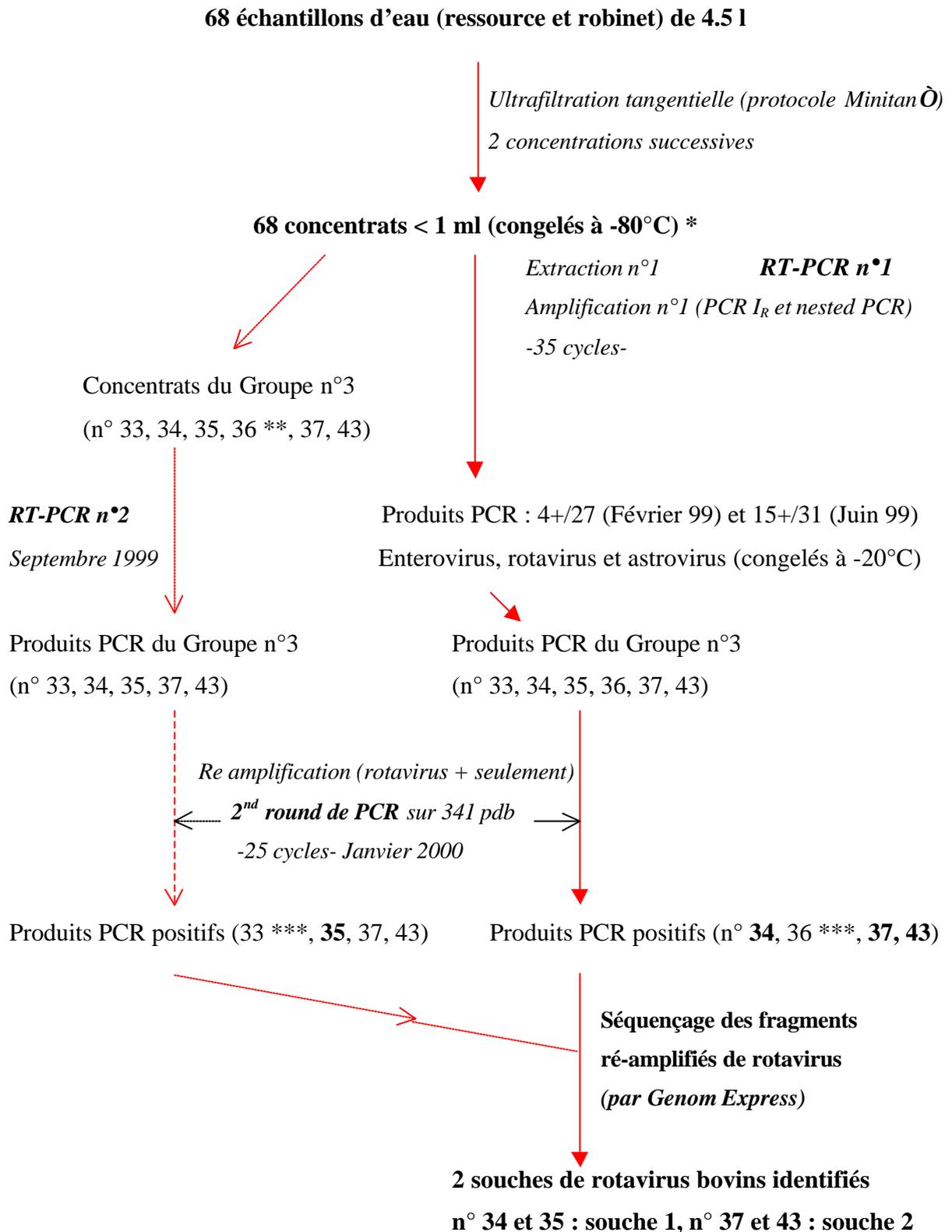
\*\* Echantillon ressource en routine, Février

\*\*\* Echantillon eau du robinet, épidémie Février

\*\*\*\* Echantillon ressource en routine, Mars

AA = Acide Aminé

Figure 1 : Devenir des échantillons d'eau destinés à l'analyse virologique



\* Panne de congélateur en Octobre 1999. \*\* matériel insuffisant. \*\*\* non envoyé pour cause de matériel génétique insuffisant.

#### 3.4.4-Résultats parasitologiques

Les principaux résultats parasitologiques sont présentés plus loin dans l'article V : "Assessment of health risks associated with the parasitical quality of drinking water (E.M.I.R.A study)".

La recherche de kystes de *Cryptosporidium* et de *Giardia* n'a porté que sur des échantillons d'eau du robinet. Contrairement à ce qui a été observé au cours de l'étude pilote, ce sont surtout des kystes de *Giardia* qui ont été retrouvés, parfois en concentration importante (110 kystes/ 100 l) (tableau VII). Un échantillon était positif pour *Cryptosporidium* (4/ 100 l dans le groupe 3, au cours de la campagne n° 6. On notera aussi que lors de l'épidémie dans le groupe 3, aucun indicateur bactérien n'a été trouvé en distribution, alors que les analyses parasitologiques ( et virologiques) étaient positives. Les eaux distribuées étaient indemnes de contamination lors des signaux épidémiques (modestes) n° 1, 2 et 4. Les résultats parasitologiques complémentaires réalisés sur les prélèvements des campagnes 6 et 8 par IMS-Chemscan sont présentés dans le tableau VIIbis. On observe que l'absence de *Giardia* dans les échantillons négatifs lors de la première analyse a été confirmée. Le prélèvement du groupe 3, positif en *Cryptosporidium* au cours de la campagne 6, s'est révélé à nouveau positif par IMS-Chemscan, avec une concentration du même ordre de grandeur. En revanche, 2 autres prélèvements négatifs en *Cryptosporidium* lors de la 1<sup>ère</sup> analyse se sont révélés positifs lors de la 2<sup>ème</sup> analyse.

Tableau VII : Résultats parasitologiques de l'eau en distribution (sur 100 l)

|                   | 1 <sup>er</sup> groupe | 2 <sup>ème</sup> groupe | 3 <sup>ème</sup> groupe | 4 <sup>ème</sup> groupe |
|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Campagne 1        | <                      | <                       | <                       | <                       |
| Campagne 2        | 30                     | 10                      | <                       | <                       |
| Campagne 3        | <                      | <                       | <                       | 110                     |
| Campagne 4        | 10                     | 20                      | 10                      | <                       |
| Campagne 5        | <                      | <                       | <                       | <                       |
| Campagne 6        | <                      | <                       | <                       | <                       |
| Campagne 7        | 10                     | <                       | <                       | <                       |
| Campagne 8        | <                      | <                       | <                       | <                       |
| <i>Epidémie 1</i> | <                      |                         |                         |                         |
| <i>Epidémie 2</i> |                        |                         |                         | <                       |
| <i>Epidémie 3</i> |                        |                         | 10                      |                         |
| <i>Epidémie 4</i> |                        | <                       |                         |                         |

Les résultats sont exprimés en nombre de kystes pour 100 l ou en valeur inférieure au seuil de détection (< : inférieur au seuil de détection fixé à 10 kystes/100 l)

Tableau VIIbis : Résultats parasitologiques complémentaires \*

|         | Date du prélèvement | Kystes détectés       | Résultats 1 <sup>ère</sup> analyse (flottation et lecture visuelle) | Résultats 2 <sup>ème</sup> analyse (IMS-Chemscan) | Résultats définitifs |
|---------|---------------------|-----------------------|---|---|----------------------|
| Groupe3 | Campagne 6          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | 4   | 2   | 3                    |
| Groupe4 | Campagne 6          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | <   | 2   | 1                    |
| Groupe1 | Campagne 8          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | <   | <   | <                    |
| Groupe2 | Campagne 8          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | <   | 8   | 4                    |
| Groupe3 | Campagne 8          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | <   | <   | <                    |
| Groupe4 | Campagne 8          | <i>Giardia</i> /100 l | <   | <   | <                    |
|         |                     | <i>Crypto</i> /100 l  | <   | <   | <                    |

\* < signifie inférieur au seuil de détection

#### 3.4.5- Les résultats de la campagne de prélèvements de Février 2000

Les résultats de la campagne de mesures complémentaires réalisée en février 2000 sont présentés dans le tableau VIII. Six prélèvements virologiques de 10 l ont été réalisés le 22 février 2000. La concentration a été réalisée dans les 48 h. Une partie des concentrats a été directement analysée par PCR pour la recherche des génomes d'entérovirus, de rotavirus, et d'astrovirus. Deux PCR successives ont été réalisées pour les entérovirus et les rotavirus. La PCR primaire (1<sup>ère</sup> amplification) a permis de détecter les échantillons les plus chargés en ARN viral. Le second round de PCR ("nested PCR") a permis de détecter les signaux plus faibles. Les prélèvements positifs lors de la PCR sur les eaux concentrées ont été séquencés. Les prélèvements 4 et 6 se sont révélés positifs en rotavirus. Les 2 séquences sont très proches de la souche témoin bovine RFC 67. Une autre partie des concentrats a été mise en culture pour la recherche d'entérovirus et de rotavirus. Après mise en culture, les échantillons ont été analysés en biologie moléculaire afin de mettre en évidence l'éventuelle présence de virus infectieux, puisque seuls des virus viables et infectants sont capables de pénétrer des cellules. Toutes les cultures cellulaires se sont révélées négatives, suggérant l'absence d'effet cytopathogène, et donc le caractère non infectant des virus présents dans nos échantillons. Les résultats PCR après culture sont également négatifs pour l'ensemble des échantillons. Cinq prélèvements parasitologiques de 200 l ont également été réalisés en distribution dans chaque groupe, et un prélèvement en ressource, au cours de cette campagne de mesures. Le prélèvement 5 s'est révélé positif en *Cryptosporidium*, le nombre de kystes détectés était cependant insuffisant pour tenter la recherche de l'espèce (*C. parvum* ou non).

Tableau VIII : Résultats microbiologiques de la campagne de Février 2000

|  | Groupe 1<br>(non traité) |           | Groupe 2<br>ressource distribution |           | Groupe 3<br>ressource distribution |          | Groupe 4<br>distribution |
|--|--------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|------------------------------------|----------|--------------------------|
| N° échantillon                                       | 4                        | 3         | 5                                  | 2         | 1                                  | 6        |                          |
| Bactériologie  | Conforme                 | Non conf. | Conforme                           | Non conf. | Conforme                           | Conforme |                          |
| Virologie<br>(PCR I <sub>R</sub> / II <sub>R</sub> ) |                          |           |                                    |           |                                    |          |                          |
| Entérovirus*   | Négatif                  |           | Négatif                            |           | Négatif                            |          | Négatif                  |
| Rotavirus**  | Positif                  |           | Négatif                            |           | Négatif                            |          | Positif                  |
| Astrovirus***  | Négatif                  |           | Négatif                            |           | Négatif                            |          | Négatif                  |
| Parasitologie  |                          |           |                                    |           |                                    |          |                          |
| <i>Giardia</i>                                       | < 0.9/100 l              | < 1/100 l | < 1/100 l                          | /         | < 1/100 l                          |          | < 1/100 l                |
| <i>Crypto</i>  | < 0.9/100 l              | < 1/100 l | = 2 /100 l                         | /         | < 1/100 l                          |          | < 1/100 l                |

\* témoin entérovirus = souche polio Sabin type 1

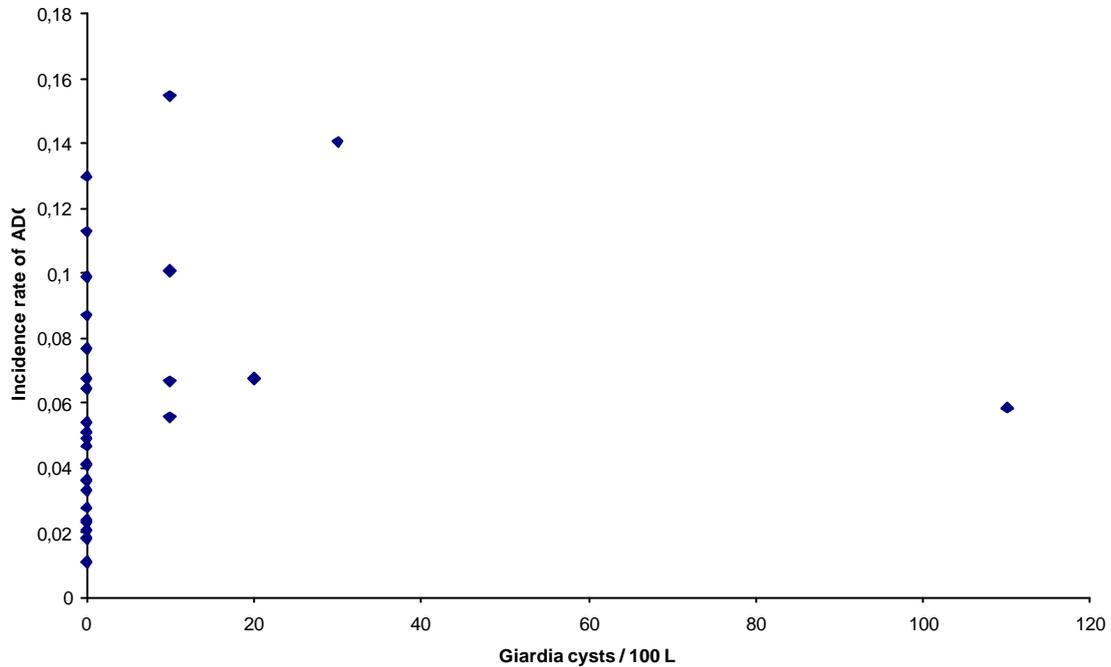
\*\* témoin rotavirus = souche bovine RFC 67

\*\*\* témoin astrovirus : souche HAstV 1

### 3.5-L'analyse statistique multivariée des données longitudinales

Les données ont été analysées de telle sorte que soit pris en compte le caractère répété des mesures sur les différents volontaires (analyse de données longitudinales), avec un ensemble de variables susceptibles de constituer des facteurs de confusion ou d'interaction. Cette analyse a fait l'objet d'un rapport du DEA de Biostatistiques de l'Université de Montpellier : "Relations entre la qualité microbiologique de l'eau et la santé d'un panel de volontaires, Analyse des données longitudinales" présenté par David Demanse en juin 2000. Une analyse univariée (voir l'annexe 9), puis bivariée ont d'abord été réalisées sur chaque prédicteur du risque (tableau IX et graphe 3). Des modèles de régression logistique par la méthode GLM (tableau X), et des modèles de régression logistique par la méthode GEE ont été développés pour permettre de prendre en compte les corrélations intra-sujets dans le temps. Différents modèles GEE ont été construits pour 3 matrices d'auto-corrélation (indépendante, échangeable, et non structurée), et la sélection du meilleur modèle a été basée sur différents critères statistiques (critère d'Akaïke, Déviance et LRT). En définitive, c'est le modèle GEE avec la structure d'auto-corrélation indépendante qui a été retenu (tableaux XI, XII, XIII, et XIV), mais les résultats des différents modèles étaient très proches.

Grphe 3 : Représentation « brute » de la densité d'incidence des TDA (+/- 3 j autour des prélèvements) en fonction de la numération des kystes de *Giardia*



Le tableau IX résume les résultats bivariés servant à la sélection des variables des modèles finaux. Il existe une liaison forte entre la morbidité digestive et les variables semaine (temps), commune (nature de la ressource), et parasites (présence de *Giardia* et/ou *Cryptosporidium*) (p de 1% à 1%°). Les variables habitat, sexe, âge, activité et bactérie (conformité réglementaire) ne semblent pas de bons prédictors de la variable TDA. Un test de corrélation de Pearson a également été effectué entre la variable TDA et la variable quantitative de consommation d'eau du robinet. Cette corrélation bivariée n'est pas significative (OR par litre d'eau bue = 0.016, p = 0.34).

Tableau IX : Identification initiale des variables associées au risque \*

|         | semaine | commune | sexe   | age    | activité | habitat | bactéries | virus  | parasites |
|---------|---------|---------|--------|--------|----------|---------|-----------|--------|-----------|
| p value | 0.0007  | 0.0052  | 0.5113 | 0.1868 | 0.3335   | 0.9199  | 0.1561    | 0.0046 | 0.0019    |

\* Chi2 de Pearson entre la variable TDA et les différents prédictors

Le tableau X présente les résultats du modèle **GLM final**. Il montre une forte variation temporelle de l'incidence des troubles digestifs. Trois périodes se détachent comme étant moins propices aux TDA : début décembre, mi janvier, et mars à avril. Novembre, fin

décembre, fin janvier, fin mai à juin, semblent en revanche être les mois les plus concernés par l'apparition de ces troubles. Le risque dépend fortement de la commune, mais peu de l'âge des volontaires.

*Tableau X : Coefficients de régression estimés, statistiques t (statistique de Wald) et OR pour le modèle GLM avec les prédicteurs pertinents*

|                               | Coefficients | t-statistics | p value            | OR   |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------------|------|
| (Intercept)                   | -2.676       | -8.080       | 7*10 <sup>-6</sup> | 0.07 |
| Semaine 1                     | -0.411       | -1.269       | 0.205              | 0.66 |
| Semaine 2                     | -0.238       | -1.500       | 0.134              | 0.79 |
| Semaine 3                     | 0.127        | 0.886        | 0.376              | 1.14 |
| Semaine 4                     | -0.214       | -2.919       | 0.004              | 0.81 |
| Semaine 5                     | 0.065        | 0.907        | 0.365              | 1.07 |
| Semaine 6                     | -0.046       | -0.856       | 0.392              | 0.96 |
| Semaine 7                     | -0.051       | 1.481        | 0.138              | 0.95 |
| Semaine 8                     | -0.045       | -1.460       | 0.144              | 0.96 |
| Semaine 9                     | -0.031       | -1.206       | 0.228              | 0.97 |
| Semaine 10                    | -0.017       | -0.359       | 0.720              | 0.98 |
| Semaine 11                    | -0.019       | -0.847       | 0.397              | 0.98 |
| Commune 1                     | -0.047       | -0.340       | 0.734              | 0.95 |
| Commune 2                     | 0.103        | 1.053        | 0.292              | 1.11 |
| Commune 3                     | -0.194       | -3.115       | 0.002              | 0.82 |
| Conso eau robinet             | 0.191        | 1.777        | 0.374              | 1.21 |
| 5-14 ans                      | -0.130       | -0.889       | 0.177              | 0.88 |
| 15-59 ans                     | -0.083       | -1.349       | 0.463              | 0.92 |
| > 60 ans                      | -0.047       | -0.734       | 0.076              | 0.95 |
| bactério (+/-)                | -0.234       | -1.421       | 0.156              | 0.79 |
| entérovirus (+/-)             | -0.172       | -0.816       | 0.415              | 0.84 |
| astrovirus (+/-)              | 0.145        | 0.801        | 0.423              | 1.16 |
| <i>Giardia</i> (10-20k/100 l) | 0.145        | 0.858        | 0.391              | 1.16 |
| <i>Giardia</i> (>20k/100 l)   | 0.357        | 2.954        | 0.003              | 1.43 |

Le tableau XI présente les résultats du **modèle GEE** retenu, réalisé avec l'ensemble des prédicteurs et pour l'ensemble de la population d'étude. L'habitat, le sexe, l'âge des volontaires, la présence de rotavirus ou de *Cryptosporidium*, ne semblent pas jouer un rôle sur l'incidence des TDA, tandis que la commune, les entérovirus, les astrovirus et *Giardia* ont un effet significatif ( $p < 0.01$ , excepté commune 1 :  $p = 0.27$ ). Il est difficile de donner un avis catégorique en ce qui concerne la consommation d'eau des volontaires et la qualité bactériologique de l'eau.

Tableau XI : Coefficients de régression estimés, signification statistique, et OR pour le modèle GEE (matrice de corrélation indépendante) avec l'ensemble des prédicteurs et des volontaires

|                                  | Coefficients | Score z | p value | OR   |
|----------------------------------|--------------|---------|---------|------|
| (Intercept)                      | -2.924       | -9.506  | 0       | 0.05 |
| Commune 1                        | -0.142       | -1.097  | 0.273   | 0.87 |
| Commune 2                        | 0.217        | 2.539   | 0.011   | 1.24 |
| Commune 3                        | -0.153       | -2.810  | 0.005   | 0.86 |
| habitat                          | -0.0156      | -0.115  | 0.908   | 0.98 |
| Sexe                             | -0.057       | -0.703  | 0.482   | 0.94 |
| Conso eau robinet                | 0.183        | 1.502   | 0.133   | 1.20 |
| 5-14 ans                         | -0.132       | -0.954  | 0.348   | 0.88 |
| 15-59 ans                        | -0.082       | -1.302  | 0.193   | 0.92 |
| > 60 ans                         | -0.047       | -0.618  | 0.537   | 0.95 |
| bactériologie                    | -0.150       | -1.105  | 0.269   | 0.86 |
| entérovirus                      | -0.490       | -2.889  | 0.004   | 0.61 |
| rotavirus                        | -0.047       | -0.365  | 0.715   | 0.95 |
| astrovirus                       | 0.401        | 3.053   | 0.002   | 1.49 |
| <i>Giardia</i> (10-20 k/100l)    | 0.182        | 1.640   | 0.101   | 1.20 |
| <i>Giardia</i> (>20 kystes/100l) | 0.211        | 2.580   | 0.010   | 1.23 |
| <i>Cryptosporidium</i>           | 0.004        | 0.028   | 0.98    | 1.00 |

Le tableau XII limite ce modèle à la classe d'âge des 0-4 ans. L'incidence des TDA chez les jeunes enfants n'est plus dépendante de la commune ( $p > 0.7$ ), tandis que l'habitat, et la qualité bactériologique de l'eau semblent avoir un effet ( $p = 0.09$  et  $p = 0.02$ ). L'effet de la qualité bactériologique est ici inverse à ce qui est observé lorsque l'analyse prend en compte

l'ensemble de la population d'étude. Les enfants de sexe féminin semblent moins sujets aux TDA que les garçons. L'effet des astrovirus est fortement augmenté (OR = 2.69 au lieu de 1.49,  $p = 0.03$ ); celui des *Giardia* également pour des concentrations comprises entre 10 et 20 kystes pour 100 l (OR = 2.27 au lieu de 1.20,  $p = 0.07$ ), mais le gradient semble disparaître pour les plus fortes concentrations, sans doute du fait d'effectifs faibles. L'estimation de l'OR associé à la consommation d'eau et aux rotavirus est sensiblement accrue, mais dans les 2 cas, cet effet demeure non significatif (respectivement OR = 1.62,  $p = 0.21$ ; et OR = 1.52,  $p = 0.23$ ). *Cryptosporidium* ne joue toujours aucun rôle ( $p > 0.7$ ).

Tableau XII : Coefficients de régression estimés, signification statistique, et OR pour le modèle GEE (matrice de corrélation indépendante) avec l'ensemble des prédicteurs et pour la classe des 0-4ans

|                                  | Coefficients | Score z | p value | OR   |
|----------------------------------|--------------|---------|---------|------|
| (Intercept)                      | -3.468       | -2.967  | 0.003   | 0.03 |
| Commune 1                        | -0.132       | -0.282  | 0.777   | 0.87 |
| Commune 2                        | 0.130        | 0.385   | 0.700   | 1.14 |
| Commune 3                        | 0.008        | 0.059   | 0.953   | 1.01 |
| habitat                          | -0.709       | -1.677  | 0.093   | 0.49 |
| Sexe                             | -0.376       | -1.584  | 0.113   | 0.69 |
| bactériologie                    | 0.480        | 1.265   | 0.023   | 2.25 |
| Conso eau robinet                | 0.810        | 2.269   | 0.206   | 1.62 |
| entérovirus                      | -1.471       | -3.362  | 0.001   | 0.23 |
| rotavirus                        | 0.419        | 1.190   | 0.234   | 1.52 |
| astrovirus                       | 0.991        | 2.220   | 0.026   | 2.69 |
| <i>Giardia</i> (10-20 k/100l)    | 0.820        | 1.844   | 0.065   | 2.27 |
| <i>Giardia</i> (>20 kystes/100l) | -0.067       | -0.243  | 0.808   | 0.94 |
| <i>Cryptosporidium</i>           | 0.161        | 0.327   | 0.744   | 1.17 |

Le tableau XIII présente les résultats du modèle GEE final pour l'ensemble des volontaires, réalisé après élimination des variables non associées au risque. Les estimations des OR sont essentiellement inchangées. La consommation d'eau de robinet ainsi que la qualité bactériologique de l'eau ont été conservées dans le modèle; elles semblent en effet avoir un certain rôle sur l'incidence des TDA.

Tableau XIII : Coefficients de régression estimés, signification statistique, et OR pour le modèle GEE (matrice de corrélation indépendante) avec les prédicteurs pertinents et pour l'ensemble des volontaires

|                                  | Coefficients | Score z | p value | OR   |
|----------------------------------|--------------|---------|---------|------|
| (Intercept)                      | -2.905       | -10.476 | 0       | 0.05 |
| Commune 1                        | -0.150       | -1.198  | 0.231   | 0.86 |
| Commune 2                        | 0.216        | 2.557   | 0.011   | 1.24 |
| Commune 3                        | -0.153       | -2.960  | 0.003   | 0.86 |
| 5-14 ans                         | -0.129       | -0.926  | 0.354   | 0.88 |
| 15-59 ans                        | -0.085       | -1.345  | 0.179   | 0.92 |
| > 60 ans                         | -0.047       | -0.606  | 0.544   | 0.95 |
| Conso eau robinet                | 0.191        | 1.578   | 0.115   | 1.21 |
| bactério                         | -0.152       | -1.220  | 0.223   | 0.86 |
| entérovirus                      | -0.513       | -3.514  | 0.0004  | 0.60 |
| astrovirus                       | 0.410        | 3.183   | 0.002   | 1.51 |
| <i>Giardia</i> (10-20 k/100l)    | 0.178        | 1.604   | 0.108   | 1.19 |
| <i>Giardia</i> (>20 kystes/100l) | 0.214        | 2.634   | 0.008   | 1.24 |

### 3.6-Construction de la fonctions dose-réponse de *Giardia*

Le travail de construction et de "validation" de la fonction dose-réponse de *Giardia* est présenté à la suite de ce chapitre dans l'article VI : "Waterborne microbial risk assessment : epidemiological construction of a dose-response function of *Giardia* (E.MI.R.A study)".

Afin d'étudier la relation dose-réponse pour *Giardia*, nous nous sommes appuyés sur le modèle final (variable *Giardia* en classe) présenté dans le tableau XIII, mais développé pour une variable quantitative incluant la consommation individuelle journalière d'eau de boisson et la numération de kystes de *Giardia*. Le Likelihood Ratio Test (LRT) n'a pas permis de développer un modèle avec la dose de *Giardia* ingérée (LRT = 6.2, pour  $\alpha = 5\%$ ), en revanche il a permis de développer un modèle après log-transformation de la numération des kystes (LRT = 1.7, pour  $\alpha = 5\%$ ). L'OR unitaire (par unité de Volume\*Ln[numération de *Giardia* + 1]) est de 1.76 (IC95%, [1.16-1.91]). L'excès de risque issu de ce modèle GEE a ensuite été comparé à celui estimé à l'aide de la fonction dose-réponse de la littérature, pour

des doses ingérées jusqu'à 5 kystes par jour (tableau XIV). La Probabilité de morbidité = Facteur de Pondération\*Probabilité d'infection. La Probabilité quotidienne d'infection pour *Giardia* =  $1 - \exp(-0.02 * \text{dose ingérée de kystes})$ ; le facteur de pondération prend en compte les incertitudes sur le rendement des techniques de détection des kystes, sur la viabilité et l'infectivité pour l'homme des souches détectées, ainsi que sur la part d'infections qui conduisent à des symptômes cliniques. Les estimations de la littérature correspondent à un *excès de risque, attribuable à une ingestion unitaire du germe*. Pour se mettre dans la même situation de risque attribuable que le modèle E.MI.R.A, il a fallu défalquer de la probabilité de maladie estimée, le bruit de fond journalier de TDA. Il est cohérent de considérer à cette fin le bruit de fond moyen estimé par le modèle GEE, soit  $6.63 * 10^{-3}$  cas par personne et par jour (le bruit de fond moyen observé au cours des 9 mois de suivi épidémiologique est de  $7.7 * 10^{-3}$  cas par personne-jour). Les excès de risque par dose de *Giardia* ingérée sont représentés en faisant l'hypothèse d'une consommation moyenne d'eau de boisson de 2 litres par personne et par jour (graphe 4). Trois hypothèses sur la valeur du facteur de pondération ont été posées : respectivement 100, 50 et 20%. Cette dernière hypothèse s'appuie sur une hypothèse de rendement de la technique de 80%, une viabilité moyenne de 50%, une infectivité pour l'homme de 50%, et enfin, une virulence de 100%. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) entre la série de données du modèle GEE et de la fonction dose-réponse, avec le facteur de pondération fixé à 20%, est excellent (99.9 %). Une hypothèse différente de consommation d'eau modifiée, mais très légèrement la corrélation des 2 courbes (si volume = 1 l/j,  $R^2 = 99.4\%$ ; si volume = 4 l/j,  $R^2 = 98.2\%$ ). Les calculs permettant la comparaison des excès de risque ont été refaits en utilisant la simulation Monte-Carlo sous le logiciel @risk. Ces résultats sont présentés dans l'article VI.

Le fichier de données analysé pour ces résultats ne comprend aucune donnée manquante sur l'exposition microbiologique hydrique. En revanche, la variable TDA en comprend 12.1%. Cela correspond, d'une part, au décalage dans le temps de l'inclusion entre les volontaires du groupe 3 (étude et suivi débutés le 26 octobre 1998) et ceux des groupes 0, 1 et 2 (suivi débuté le 16 novembre 1998); et d'autre part, aux absences ponctuelles de certains volontaires. Le fichier de données comprend moins de 2% de données manquantes sur les variables individuelles, excepté la variable consommation d'eau du robinet qui en comprend 16.9%. Ces données manquantes ont été remplacées par la moyenne de consommation d'eau du robinet des individus appartenant au même groupe de commune et à la même classe d'âge. L'analyse refaite avec ce nouveau fichier a fourni des résultats similaires à ceux

obtenus avec le fichier initial (résultats non présentés). Il a été fait le choix de ne conserver que les résultats de l'analyse portant sur le fichier initial avec données manquantes sur la variable individuelle de consommation d'eau de robinet.

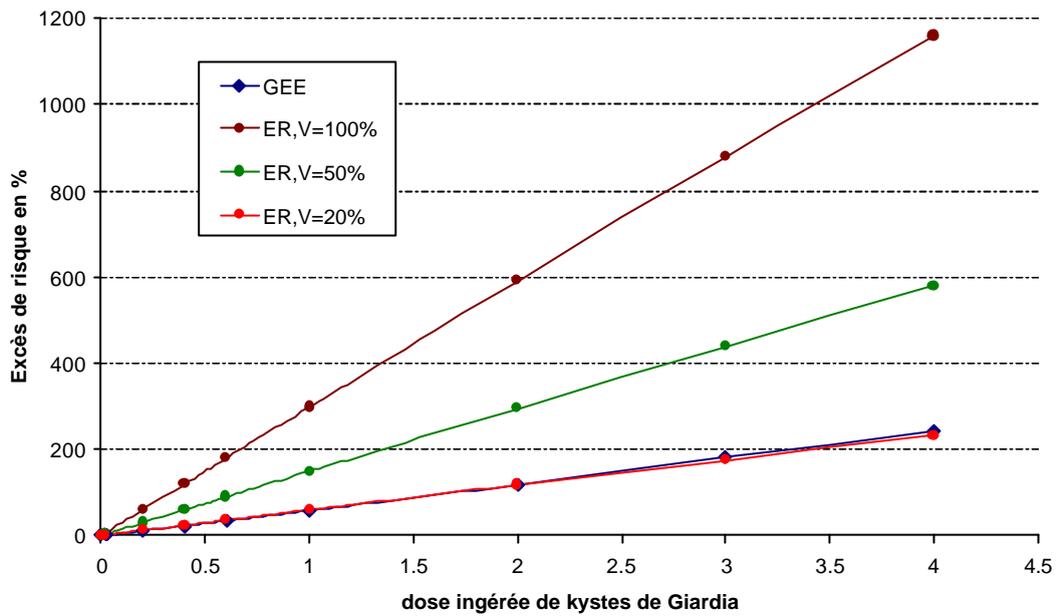
*Tableau XIV : Comparaison de l'excès de risque (en %) des troubles digestifs calculé par le modèle GEE final à celui estimé par la fonction dose-réponse de la littérature, pour différents niveaux de doses journalières et pour différentes hypothèses sur le facteur de pondération*

| Concentration                               |                            | Excès de risque de troubles digestifs     |                 |                 |                        |
|---|----------------------------|---|-----------------|-----------------|------------------------|
| dans l'eau de<br>boisson en<br>kystes/100 l | Dose<br>ingérée<br>(2 l/j) | Fonction dose-réponse de la littérature * |                 |                 | Modèle GEE<br>E.MI.R.A |
|   |                            | Pondération 100%                          | Pondération 50% | Pondération 20% |                        |
| 0   | 0                          | 0   | 0               | 0               | 0                      |
| 1   | 0.02                       | 6   | 3               | 1.2             | 1.1                    |
| 10  | 0.2                        | 60  | 30              | 12              | 11                     |
| 20  | 0.4                        | 120                                       | 60              | 24              | 23                     |
| 30  | 0.6                        | 180                                       | 90              | 36              | 34                     |
| 50  | 1                          | 300                                       | 149             | 60              | 58                     |
| 100   | 2                          | 592                                       | 296             | 118             | 118                    |
| 150   | 3                          | 879                                       | 439             | 176             | 181                    |
| 200   | 4                          | 1160                                      | 580             | 232             | 245                    |
| 250   | 5                          | 1436                                      | 718             | 287             | 310                    |

*\* Paramètres issus de l'expérience sur volontaires par Rendtorff (1954)*

On observe une remarquable concordance entre les valeurs calculées à partir de la fonction de risque issue de l'étude, et celles qui s'appuient sur les données expérimentales, pour un facteur de pondération de l'ordre de 20 %.

Grphe 4 : Comparaison des excès de risque (ER) de trouble digestifs calculés pour le modèle GEE et pour la fonction dose réponse de la littérature (différentes hypothèses sur le facteur de pondération, noté V sur la figure)



**3.7-Article II : Description de la consommation d'eau de boisson en France à l'usage des épidémiologistes et évaluateurs du risque (étude E.MI.R.A)**

**DESCRIPTION DE LA CONSOMMATION D'EAU DE BOISSON EN FRANCE A L'USAGE DES  
EPIDEMIOLOGISTES ET EVALUATEURS DU RISQUE (ETUDE E.MI.R.A.)**

*(LA CONSOMMATION D'EAU DE BOISSON EN FRANCE)*

**DESCRIPTION OF DRINKING WATER INTAKE IN FRANCE FOR EPIDEMIOLOGISTS AND RISK  
ASSESSORS (E.MI.R.A. STUDY)**

*(DRINKING WATER INTAKE IN FRANCE)*

L. Gofti-Laroche 1 , JL Potelon 2 , E. Da Silva 3 , D. Zmirou 1

1 Laboratoire de Santé Publique, Faculté de Médecine de Grenoble

2 Département Egeries, ENSP, Rennes

3 Careps, CHU de Grenoble

**Correspondance** à Leïla Gofti-Laroche, Laboratoire de santé Publique, Faculté de Médecine de Grenoble, Domaine de La Merci, 38 706 La Tronche Cedex.

Tel : 04 76 63 88 15. Fax : 04 76 51 01 58. E-mail : leila.gofti@ujf-grenoble.fr

**Remerciements** : L'étude E.MI.R.A a bénéficié du soutien financier du Ministère chargé de l'Environnement, des Agences de l'Eau, du Secrétariat d'Etat à la Santé et d'Anjou-Recherche (Vivendi). Les auteurs remercient également tous les partenaires scientifiques du programme de recherche, ainsi que les personnes volontaires des communes d'étude.

**Mots clés** : Eau de boisson, exposition, consommation, épidémiologie, évaluation du risque

**Key words** : Drinking water intake, waterborne exposure, epidemiology, risk assessment

---

Article soumis à la RESP en Janvier 2001, cette version tient compte des commentaires des relecteurs, elle a été retournée à la RESP le 30 avril 2001.

## **Résumé**

L'évaluation de l'impact sanitaire des agents nocifs véhiculés par l'eau de boisson nécessite une bonne caractérisation de l'exposition des individus et des populations. Cette caractérisation implique une meilleure connaissance des niveaux de polluants dans l'eau, et de leur variabilité temporelle, ainsi qu'une appréciation des volumes d'eau ingérés. Si de nombreux travaux récents, anglo-saxons pour la plupart, ont porté sur les teneurs en agents chimiques ou microbiologiques, ils sont moins nombreux à s'être intéressés à l'estimation de la consommation d'eau de boisson en population générale. Dans le cadre du programme de recherche E.MI.R.A concernant le risque lié à la présence de micro-organismes pathogènes véhiculés par voie hydrique, ce travail décrit en détail la consommation journalière d'eau de boisson des 544 volontaires de l'étude, appréciée par questionnaire à deux reprises, au cours d'un suivi longitudinal de 9 mois. Les résultats diffèrent selon la saison d'enquête. L'utilisation d'eau du robinet pour divers usages alimentaires suit une distribution normale (moyenne arithmétique hiver = 1.55 l/j, IC95%[0.20-2.90]; moyenne arithmétique printemps = 1.78 l/j, IC95%[0.13-3.43]). La consommation d'eau de boisson totale suit une distribution log normale (moyenne géométrique hiver = 1.60 l/j, écart type = 1.73 l/j; moyenne géométrique printemps = 1.92 l/j, écart type = 1.70). L'eau du robinet représente plus de 80% de la consommation totale d'eau de boisson, l'eau du robinet consommée sans aucune modification représente 42% de l'eau de boisson totale. Les résultats sont également présentés par classe d'âge, et comparés aux valeurs de consommation disponibles dans la littérature. Ce travail fournit donc des données pour développer dans le contexte français la démarche d'évaluation du risque et les études d'épidémiologiques s'intéressant au risque infectieux ou chimique d'origine hydrique.

## **Abstract**

Assessment of risks associated with waterborne pollutants requires a good characterization of the exposure of individuals and populations. This characterization implies knowledge of pollutants' levels in water and their time variability, and also estimation of drinking water consumption. Several studies were conducted, mostly in North America, on levels of chemical contaminants or prevalence of pathogens. Few studies were conducted on drinking water intake of the general population. This work, included within the E.MI.R.A study which was set up to assess waterborne infectious risks, describes in details daily drinking water consumption of 544 French volunteers. Data were collected by self-questionnaires. Results

differ according to the season. Tap water usage for food follows a normal distribution (arithmetic mean in winter = 1.55 L/j, 95%CI [0.20-2.90]; arithmetic mean in spring = 1.78 L/j, [0.13-3.43]). Total drinking water intake follows a log-normal distribution (geometric mean in winter = 1.60 L/j, standard deviation = 1.73 L/j; geometric mean in spring = 1.92 L/j, standard deviation = 1.70 L/j). Tap water intake amounts to more than 80% of total drinking water consumption, and pure tap water (i.e not added, modified nor boiled) amounts to 42% of total drinking water. Results are also displayed by age, and compared to other data available in the literature. This work provides data that can be used to develop risk assessment and epidemiological studies in the field of chemical or infectious risks in the context of France.

## **Introduction**

Les données de consommation d'eau de boisson en général, et de consommation d'eau du robinet en particulier, sont rares dans les pays industrialisés, et tout particulièrement en France. Ces données ont pourtant leur importance pour mener à bien une étude épidémiologique ou une démarche d'évaluation du risque hydrique. L'exposition par la voie hydrique est souvent classée en fonction de la nature de la ressource, de la nature du traitement, et bien sûr des concentrations de contaminants chimiques ou des dénombrements de micro-organismes; mais il est nécessaire de prendre également en compte les variations inter et intra-individuelles [1]. Une mauvaise estimation des volumes d'eau réellement ingérés peut donc induire des erreurs de classement dans l'analyse de l'association entre l'exposition aux contaminants ou pathogènes hydriques et leur effet sur la santé [1] [2]. La démarche d'évaluation du risque, développée aux Etats-Unis, et mise en application dans différents pays anglo-saxons, connaît maintenant un essor en France. La majorité des études anglo-saxonnes d'évaluation du risque utilisent la valeur de 2 litre d'eau de boisson par personne et par jour (1 litre pour les enfants), tel que recommandée par l'US-EPA [3]. Les directives européennes, basées sur les recommandations de l'OMS, se réfèrent également à la valeur de 2 l d'eau consommée par jour et par personne de 60 kg [4]. C'est donc tout l'édifice réglementaire national et international sur la qualité de l'eau de boisson qui utilise cette valeur. Mais celle ci est basée sur des données maintenant anciennes (1977) [5], qui ne sont sans doute plus représentatives des nouveaux comportements alimentaires de la population nord-américaine, et a priori peu représentatives de la consommation d'eau de boisson en France. Le développement d'études épidémiologiques ou d'évaluation des risques au niveau

national, tirerait avantage à disposer de données françaises récentes sur les volumes d'eau réellement ingérés, et sur la part des différentes formes de consommation d'eau de boisson, voire des données spécifiques à certain sous-groupes comme les enfants de 0-4 ans. De telles données peuvent être utiles aussi bien pour des micro-organismes émergeant comme une menace pour la santé publique, comme *Cryptosporidium*, que pour des substances chimiques toxiques bien connues comme le plomb. Le travail présenté ici s'inscrit dans le cadre du programme de recherche E.MI.R.A (Epidemiology and Microbial Risk Assessment); il vise à fournir, à partir d'enquêtes détaillées sur la consommation d'eau de boisson, des données utilisables par les épidémiologistes et/ou les évaluateurs du risque dans le champ des risques sanitaires d'origine hydrique.

## **Matériel et Méthode**

### ***L'étude E.MI.R.A***

L'étude E.MI.R.A se proposait de valider, dans les conditions naturelles d'exposition des individus et de survie des micro-organismes dans le milieu, les fonctions dose-réponse établies dans la littérature pour certains virus entériques (entérovirus, rotavirus et astrovirus) et pour deux protozoaires (*Giardia* et *Cryptosporidium*). Le protocole d'étude consistait à coupler, d'une part, un suivi longitudinal prospectif de l'incidence quotidienne des troubles digestifs aigus au sein d'une population de volontaires alimentés par une ressource d'eau vulnérable, et d'autre part, un suivi de la qualité microbiologique de l'eau du robinet distribuée [6]. L'étude E.MI.R.A s'est attachée à estimer au mieux l'exposition hydrique des volontaires : outre les analyses microbiologiques de l'eau, les volumes d'eau ingérés par chaque volontaire ont été estimés au moyen d'enquêtes de consommation d'eau.

### ***Les enquêtes de consommation d'eau de boisson***

Deux enquêtes détaillées de la consommation d'eau de boisson ont été réalisées au cours des 9 mois de l'étude E.MI.R.A (novembre 1998 à juin 1999).

#### ***La population d'étude***

Elle est représentée par 544 personnes répartis en 176 foyers. Les critères de sélection des personnes étaient une consommation « habituelle » d'eau de robinet, et le fait d'habiter une commune desservie par l'une des 4 ressources d'Isère ou de Savoie sélectionnées pour l'étude. La première ressource (forage dans une nappe phréatique) alimente une commune rurale de 5000 habitants, proche de Grenoble (Isère) ; la seconde (ressource karstique)

alimente 2 petites communes rurales (totalisant 3000 habitants) dans le massif de Chartreuse (Isère), la troisième (puits en moraine) alimente une petite commune (1700 habitants) proche de Chambéry (Savoie), enfin, la quatrième ressource (un lac) alimente 7 petites communes rurales de Savoie (totalisant 6000 habitants). Le recrutement, basé sur le volontariat, a été réalisé par différentes voies : appel à volontaire dans les médias locaux (presse, radio); courriers transmis par les écoles aux parents d'élèves des communes d'étude, courriers aux foyers alimentés par les réseaux d'alimentation de l'étude grâce aux fichiers d'adresses fournis par les responsables des réseaux. Le recrutement visait à inclure un nombre élevé d'enfants car cette fraction de la population présente généralement une morbidité digestive supérieure à celle des adultes.

### ***Recueil des données***

Une enquête sur la consommation d'eau de boisson, sous ses différentes formes, a été réalisée en janvier 1999 afin de caractériser la consommation hivernale des volontaires; la seconde enquête a été réalisée au mois de mai 1999 afin de caractériser leur consommation printanière. Chaque enquête a porté sur la consommation d'eau de boisson un jour de semaine (le mardi le plus souvent) et sur un jour de week-end (le samedi). Les volontaires avaient à remplir un questionnaire qui leur était envoyé par courrier avec une note explicative et une enveloppe T pour le retour, une quinzaine de jour avant le début de l'enquête. Il était envoyé autant de questionnaires que de personnes dans le foyer, et chaque adulte avait à remplir lui-même son questionnaire. Pour les enfants, celui-ci était complété par un adulte référent. Le remplissage du questionnaire a fait l'objet d'explications complémentaires à l'occasion du suivi épidémiologique (réalisé par téléphone) la semaine de l'enquête, lorsque cela était nécessaire. La consommation individuelle d'eau du robinet faisait l'objet de questions détaillées : il était demandé à chaque volontaire de préciser le lieu de consommation (commune d'étude ou autre), les volumes consommés en nombre de verres, estimés à 20 cl, ainsi que leur usage (consommation directe sans ajout, avec ajout – sirops ...-, chauffée ou bouillie -thé, café ...-). La consommation d'eau embouteillée était également demandée. Les volontaires ont également été interrogés à l'occasion des enquêtes sur un éventuel arrêt de la consommation d'eau du robinet au cours du suivi épidémiologique. La ou les raisons motivants cet arrêt ont été exploré(es) (réponse libre). La consommation journalière moyenne de chaque classe d'eau a été calculée en litre par jour, pour chaque enquête, sur la base d'une pondération des données recueillies en semaine (5/7) et des données recueillies pendant le week-end (2/7). Le questionnaire a porté sur la

consommation totale d'eau du robinet et la consommation totale d'eau embouteillée. La somme de ces 2 catégories d'eau constitue l'eau de boisson totale. Le questionnaire a permis de distinguer l'eau du robinet consommée dans la commune de domicile et celle consommée en dehors. L'eau du robinet consommée au domicile est partagée entre l'eau du robinet consommée pure (c'est à dire sans modification) et l'eau du robinet consommée après modification (soit avec ajout de jus, de sirop par exemple, soit chauffée pour le thé, le café, la soupe, ou la préparation des biberons) (tableau I).

### ***Traitement statistique des données***

L'analyse statistique a été réalisée grâce à Epi-Info dans la version 6 d'Epi-Info, et au logiciel SPSS. Les consommations d'eau du robinet totale, d'eau du robinet bue pure (froide et sans modification), d'eau du robinet modifiée, d'eau du robinet bue à l'extérieur de la commune du domicile, d'eau embouteillée et d'eau de boisson totale, ont été calculées par groupe de communes, par habitat, par Catégorie Socio-Professionnelle (CSP), par sexe et par âge. La normalité des distributions des données a été testée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par une analyse de variance ou par un test de Kruskal & Wallis lorsque les variances n'étaient pas homogènes. Les comparaisons de proportions ont été réalisées par un test du Chi 2. Une régression linéaire multiple a permis de modéliser la consommation d'eau de boisson (robinet, bouteille, totale) en fonction des communes, avec ajustement sur la classe d'âge. Enfin, une standardisation directe a été opérée pour estimer la consommation de la population d'étude qui aurait la structure par âge de la population française.

### **Résultats**

Au cours de l'étude E.MI.RA, le taux de participation à la 1ère enquête de consommation d'eau en janvier 1999 était de 69%. Pour la 2ème enquête en mai 1999, ce taux a été porté à 79% après une relance par courrier et par téléphone. La structure de la population d'étude, par sexe, âge et CSP, a été comparée à celle de la population générale des mêmes communes (tableau II). La population de volontaires n'est pas parfaitement représentative de la population générale dont elle est issue. Les enfants de 5 à 14 ans y sont légèrement plus représentés, aux dépens de la tranche d'âge des plus de 60 ans. Les ouvriers sont très peu représentés, à l'opposé des cadres et professions intellectuelles, des professions

intermédiaires, et des employés. Les répondants sont en revanche semblables aux volontaires, en particulier pour leur âge ( $p=0.9$ ).

La consommation totale d'eau de boisson ne diffère pas selon le sexe, le type de logement - immeuble ou maison individuelle, et la CSP (respectivement  $p=0.57$ ,  $p=0.27$ , et  $p=0.22$ ). Les résultats diffèrent clairement selon la saison ( $p<0.01$ ), les volumes d'eau consommée sont en effet supérieurs en saison plus chaude; les résultats des 2 enquêtes de consommation d'eau de boisson sont donc présentés séparément.

Les consommations totales d'eau du robinet et d'eau embouteillée (restreinte aux personnes dont cette consommation est non nulle) suivent une distribution proches de la normalité. Les moyennes arithmétiques correspondantes sont, pour l'eau du robinet, 1.55 l/j en hiver (IC 95%, [0.20-2.90]), et 1.78 l/j au printemps (IC 95%, [0.13-3.43]); et pour l'eau embouteillée, 0.85 l/j en hiver (IC 95%, [0-2.14]), et 1.07 l/j au printemps (IC 95%, [0-2.78]) (graphe 1 et 3, tableau III). La consommation d'eau de boisson totale suit une distribution proche de la log normalité. En hiver la moyenne géométrique est de 1.60 l/j ( $\sigma = 1.73$  l/j); et 1.92 l/j ( $\sigma = 1.70$  l/j) au printemps (graphe 2, et tableau III). Les résultats diffèrent en fonction de l'âge ( $p<0.01$ ) et sont donc également présentés pour chacune des 4 classes d'âge dans les tableaux III et IV. La consommation totale d'eau de boisson croît de manière quasiment linéaire entre 0 et 60 ans puis décroît légèrement. Elle est pratiquement doublée entre les jeunes enfants et les adultes, quelque soit la saison d'enquête, avec respectivement en hiver et au printemps, 0.9 l/j et 1.4 l/j pour les 0-4 ans, et 2.1 l/j et 2.4 l/j pour les 15-59 ans. Les enfants de 0 à 1 an, qui constituent un sous-groupe particulièrement sensible sont très peu représentés dans notre étude (1% environ). Leur consommation moyenne d'eau du robinet est de 1.0 l/j en hiver et 1.3 l/j au printemps. La structure par âge de nos volontaires ne correspondant pas à celle de la population source (communes de recrutement) ni à celle de la population française (recensement 1999), les estimateurs des variables de consommation d'eau (eau du robinet et eau de boisson totale) ont été recalculés pour une population type ayant la structure par âge de la population française (tableau V).

La répartition des moyennes journalières des différentes formes de consommation d'eau du robinet sont présentés dans le tableau IV. Au cours des 2 enquêtes, la consommation totale d'eau du robinet représente plus de 80% de la consommation totale d'eau de boisson dans cette population de volontaires (respectivement 85% pour l'enquête hiver, et 81% pour

l'enquête printemps). La consommation d'eau du robinet hors de la commune du domicile représente environ 12% dans les 2 cas. L'eau du robinet consommée pure (non additionnée de sirop, jus, ... ni chauffée, ni bouillie) représente 42% de la consommation totale d'eau de boisson, 50% de la consommation totale d'eau du robinet, et 57% de l'eau du robinet bue sur la commune du domicile.

Dans certaines études épidémiologiques ou d'évaluation du risque, il peut être intéressant de prendre en considération les arrêts provisoires de consommation. L'étude fournit des données sur ce point. Dans le cadre de l'étude, 9.6% des volontaires (52/544) déclarent avoir suspendu leur consommation au moins une fois au cours des 9 mois du suivi épidémiologique, et ce pour une durée plus ou moins courte (généralement quelques jours, mais parfois plusieurs semaines). Le pourcentage de volontaires concernés par au moins un arrêt diffère entre les 4 groupes de communes ( $p=0.006$ ) (tableau VI). Les raisons de ces arrêts ont été évoquées spontanément et regroupées en 5 catégories : 34.6 % des réponses sont liées à la dégradation des caractères organoleptiques de l'eau (à l'occasion d'une pluviométrie abondante, liée à un mauvais goût de l'eau, à une odeur de javel notamment, ou aspect turbide avec dépôts blanchâtres, couleur marron ...); 23.1 % des arrêts de la consommation d'eau du robinet sont liés à des considérations sanitaires (avec ou sans troubles digestifs); 21.2 % des réponses sont liées à un souhait ponctuel de consommation exclusive d'eau minérale (cure d'eau minérale, côté pratique de la bouteille ...); et 8.6 % ont des justifications diverses (calculs urinaires, grossesse, régime particulier, passage du biberon au lait de croissance chez le jeune enfant ...). Les déplacements hors de la commune et les voyages représentent 18.3 % des raisons d'arrêt de consommation d'eau du robinet. Enfin, 2.9 % des arrêts n'ont pas été explicités.

La consommation d'eau de boisson des volontaires E.MI.R.A diffère en fonction du groupe de commune ( $p<0.01$ ). La structure par âge étant différente dans chaque groupe de commune, une régression linéaire multiple (RLM) a été réalisée afin de tester l'effet du groupe ajusté sur l'âge. Les écarts de consommation entre groupes sont très variables selon la catégorie d'eau (eau du robinet ou eau de boisson totale) et la saison d'enquête; aussi l'interprétation de l'effet groupe reste donc assez difficile. La différence maximale observée entre la moyenne de consommation dans un groupe et celle de l'ensemble des volontaires dans la même tranche d'âge est de 0.3 l/j; cette différence est inférieure à 0.2 l/j (soit moins d'un verre d'eau) pour 60% des données. Il a été fait le choix de ne pas tenir compte de cette

faible différence entre groupes, car cela aurait inutilement alourdi l'article sans présenter de véritable intérêt sur un plan pratique.

## **Discussion**

Les données de consommation d'eau du robinet recueillies auprès des volontaires de l'étude E.MI.R.A suivent une distribution normale, tandis que les données d'eau de boisson totale approchent une distribution log normale, souvent rapportée comme caractérisant le mieux la consommation d'eau de boisson [3] [7]. Les valeurs observées peuvent être comparées à d'autres études (tableau VII). Elles sont supérieures ou comparables à celles retrouvées dans la littérature anglo-saxonne en ce qui concerne l'eau de boisson totale : 2 études rapportent la valeur de 1.9 l/j [1] [7], et une étude 1.6 l/j [8]. En ce qui concerne l'eau du robinet, les données de l'étude E.MI.R.A sont supérieures, puisque les différentes études rapportent les valeurs de 0.8 l/j, 1.1 l/j et 1.2 l/j; il en est de même des valeurs de consommation d'eau du robinet pure et sans modification, qui sont alors de 0.3 l/j, 0.4 l/j, 0.7 et 0.8 l/j [1] [7] [8] [9]. Il convient de souligner que ce travail s'attache à fournir des données pour une meilleure estimation de l'exposition hydrique par voie d'ingestion, mais il ne faut pas oublier que dans une démarche plus globale il sera parfois nécessaire de s'intéresser aux autres voies d'exposition telle que la voie d'inhalation (pour les Légionnelles par exemple) ou la voie cutanée (pour les HAP par exemple).

Certains traits du protocole doivent être discutés, car ils peuvent en influencer les résultats. La population d'étude présente des caractéristiques différentes de celles de la population générale. Les professions intermédiaires et supérieures sont sur-représentées, ce qui constitue un phénomène couramment observé dans des études procédant par appel à volontaires ("Hawthorne effect" [10]); la CSP cependant n'apparaît pourtant pas ici comme un élément déterminant pour la consommation d'eau de boisson, en terme de volumes, mais pourrait l'être pour le type d'eau consommée (robinet ou embouteillée). De même, les enfants de 5 à 14 ans sont plus représentés dans l'échantillon. Le mode de recrutement et les objectifs de l'étude justifient ce déséquilibre, puisqu'il s'agissait de disposer d'un nombre suffisant d'enfants pour apprécier les risques de morbidité digestive dans cette tranche d'âge. La standardisation sur l'âge a cependant montré un faible impact sur les moyennes de consommation d'eau.

Si le projet E.MI.R.A avait pour objectif principal d'étudier le risque lié à la qualité de l'eau du robinet, caractérisée au travers de paramètres microbiologiques non conventionnels, les communes sélectionnées une eau bactériologiquement conforme, donc réputée sans danger du point de vue de la réglementation. Les volontaires n'avaient donc pas de raison d'avoir un profil de consommation d'eau particulier, en volume. En revanche, par protocole, les volontaires étaient recrutés parmi les personnes déclarant être consommatrices d'eau du robinet. Aussi, les parts relatives de consommation d'eau du robinet et d'eau embouteillée, qui sont d'une grande variabilité selon les zones géographiques, sont propres aux volontaires E.MI.R.A, et ont sans doute tendance ici à surestimer le poids de l'eau du robinet. Cela est vrai aussi pour un possible "effet grappe" lié au fait que les 544 volontaires sont regroupés en 176 foyers.

En toute rigueur, les valeurs de consommation d'eau proposées dans ce travail ne peuvent donc prétendre être parfaitement représentatives de la population générale française; en revanche, elles fournissent sans doute une bonne approximation de la consommation d'eau de boisson totale pour la population générale. Ces valeurs peuvent donc être utilisées dans le cadre d'études épidémiologiques ou de travaux d'évaluation du risque portant sur le risque sanitaire associé à l'eau de boisson car, à défaut de traduire des données locales spécifiques à la population étudiée, elles expriment vraisemblablement la situation d'un «worst case », ou "scénario pessimiste", fréquemment choisi dans de tels travaux.

En terme d'évaluation du risque, les données de consommation d'eau pertinentes sont souvent celles qui caractérisent la consommation à long terme- sauf en matière de risque accidentel-; le manque de représentativité des données recueillies sur une courte période peut alors apparaître imparfaite. La littérature rapporte cependant une faible variabilité intra-individuelle de cette consommation dans le temps [1] [7]. Dans l'étude E.MI.R.A, la consommation d'eau hors de la commune du domicile représente 12% environ, alors que certains auteurs, dans des contextes plus urbains, rapportent jusqu'à 25% de la consommation journalière d'eau à l'extérieur du domicile [7] [8]. Les études épidémiologiques ou d'évaluation des risques devraient donc mieux prendre en compte la distribution spatiale de cette consommation, lorsque cette question se pose. L'estimation de la consommation quotidienne d'eau par le recueil des données un jour de semaine et un jour de week-end, pondérées respectivement selon un schéma 5/7 et 2/7 semble être pertinent [1] [8]. Cependant, les disparités entre les consommation de semaine et de week-end, qui

peuvent être utiles dans certaines situations, ne sont pas mises en évidence par la présentation de nos résultats (en toute logique, la consommation d'eau hors de la commune est inférieure le week-end par rapport à la semaine). L'auto-enregistrement des données de consommation utilisé au cours de l'étude E.MI.R.A est le procédé le plus couramment utilisé pour ce type de recueil. Malgré la possibilité de biais ou d'erreurs, il a été montré que ce procédé est fiable pour ce type de donnée [7].

La plus vaste base de données de consommation d'eau en population générale est celle présentée par Ershow et Cantor qui reprennent la vaste enquête de l'US-DA (Ministère de l'agriculture américain) [11]. Ces données portent sur 30 770 personnes enquêtées entre 1977 et 1978 aux Etats-Unis. Burmaster a également repris ce travail en envisageant, comme d'autres auteurs avant lui, de pondérer les consommations d'eau par le poids de l'individu, mais il apparaît que cette pondération n'améliore pas la qualité des données [7]. Ces données anciennes, qui sont récapitulées dans le National Academy of Sciences Report de 1977, pouvaient ne plus être représentatives des nouvelles habitudes de consommation de la population nord-américaine, et encore moins, représentatives des données de consommation d'eau en France. Les données de l'étude E.MI.R.A en sont pourtant relativement proches, bien que sensiblement supérieures, en particulier en ce qui concerne la consommation d'eau du robinet.

La consommation moyenne *d'eau de boisson totale* estimée ici est proche de la valeur de référence de 2 l/j conventionnellement utilisée dans les études d'évaluation du risque, et qui guide l'élaboration des normes sur la qualité de l'eau potable. Les valeurs du percentile 95 en revanche sont souvent supérieures, variant de 2.1 à 4.8 l/j selon l'âge. Le percentile 95 pour la consommation totale *d'eau du robinet* dépasse également la valeur de référence, et est pour certaines catégories supérieure à 3 l/j. La valeur de référence de 2 l/j apparaît donc comme une bonne estimation de la consommation moyenne de l'eau de boisson et comme une légère surestimation de la consommation moyenne d'eau de robinet. Elle sous-estime en revanche assez nettement les valeurs correspondantes du percentile 95, souvent usité dans une procédure normative. En 1998, Burmaster s'est également intéressé à la consommation d'eau des femmes enceintes et allaitantes. Leur consommation moyenne d'eau de boisson totale est respectivement de 2.1 l/j et 2.2 l/j (percentile 95 : 3.5 l/j et 3.4 l/j), leur consommation moyenne d'eau de robinet est de 1.2 et 1.3 l/j (percentile 95 : 2.4 l/j et 2.2 l/j). L'emploi de la valeur de référence, pour ces sous-groupes particuliers de la population, ou

plus généralement dans le cadre d'études d'évaluation du risque reposant sur le scénario du "worst case", pourrait donc conduire à une sous-estimation du risque encouru. La question se pose donc, pour les épidémiologistes et les évaluateurs du risque, de choisir pour chaque étude la catégorie d'eau la plus pertinente, et donc les valeurs correspondantes dans les bases de données disponibles. Ce choix dépend essentiellement de la nature du polluant étudié et de la population cible considérée. Ainsi, dans le cadre d'une évaluation des risques chimiques d'origine hydrique, il pourra être fait le choix d'utiliser les valeurs de consommation totale d'eau du robinet, alors que dans le cadre d'une étude de risques microbiologiques hydriques il pourra s'avérer plus juste de ne prendre en compte que l'eau du robinet consommée pure (froide et sans aucune modification). Au cours de l'étude E.M.I.R.A, la moyenne d'eau consommée pure est comprise entre 0.5 et 1.0 l/j, et le percentile 95 entre 1.6 et 2 l/j. On note donc que la valeur de référence conventionnelle constitue une bonne estimation de la valeur du percentile 95 de l'eau du robinet consommée pure.

Contrairement aux études anglo-saxonnes, l'eau de boisson totale dans l'étude E.M.I.R.A ne prend pas en compte toutes les formes de consommation d'eau d'origine "alimentaire" (à savoir l'eau comprise dans le riz, les pâtes etc ...). Les questionnaires de l'étude se limitaient à l'addition d'eau dans des préparations liquides (boissons chaudes, soupes, sirops, biberons par exemple). L'étude Québécoise montre le côté négligeable de l'eau d'origine alimentaire; elle n'y représentait que 7% environ (0.12 l/j sur 1.62 l/j) de l'eau de boisson totale, l'eau contenue dans les aliments autres que les préparations liquides n'en constituant en fait que 4% (0.069 l/j sur 1.617 l/j) [8]. En revanche, une étude conduite dans le Haut-Rhin sur 91 personnes a évalué à 17% la consommation d'eau du robinet issue de l'alimentation solide (pâtes, riz, semoule ...) [12]. La faible taille de l'échantillon, le mode différent de recueil des données et les objectifs très différents de l'étude sont peut être à l'origine de ses conclusions différentes. Cette question reste donc en débat.

Les enquêtes de consommation d'eau réalisées aux Etats-Unis et au Canada n'ont pas montré de différence liées à la saison contrairement à notre étude [9] [13]. Dans la littérature, la consommation d'eau de boisson totale ne varie pas en fonction du statut professionnel; en revanche il apparaît que les femmes au foyer ou n'exerçant qu'à temps partiel consomment plus d'eau de robinet [1] comme dans notre étude. Certains auteurs font également apparaître que la consommation totale d'eau de boisson ne diffère pas en fonction de l'aire de résidence,

le sexe et l'âge, tandis que dans notre étude ces différences existent. Ainsi, l'étude pilote québécoise ne fait pas apparaître de différence de consommation d'eau de boisson en fonction de l'âge, mais cela est peut être lié à la petite taille de l'échantillon (125 personnes) [8]. D'autres auteurs en revanche observent une augmentation de la consommation d'eau de boisson avec l'âge, qui continue à augmenter après 65 ans, tandis qu'elle décroît après 60 ans dans notre étude [3]. Globalement, la consommation d'eau de boisson des volontaires double entre la petite enfance (0-4 ans) et l'âge adulte (15-59 ans), mais comme le souligne l'OMS dans ses recommandations, les enfants consomment proportionnellement à leur poids, plus d'eau que les adultes. Comme il s'agit d'une population par ailleurs plus sensible à certains agents toxiques et/ou microbiologiques, l'OMS a établi des valeurs guides sur la base d'un poids corporel de 5 kg pour les nourrissons, et 10 kg pour les jeunes enfants, avec respectivement une consommation d'eau de 0.75 l/j et de 1 l/j. Une note de l'AFSSA datée du 30 novembre 2000, relative à la présence d'atrazine et de ses métabolites dans l'eau de captage de Seine et Marne, fait clairement apparaître que les valeurs limites pour les nourrissons et les jeunes enfants sont très inférieures aux valeurs limites pour les adultes (respectivement 0.4 µg/l, 0.6 µg/l et 2 µg/l) [14]. Si l'hypothèse de consommation d'eau des enfants était basée sur les volumes d'eau du robinet ingérés au printemps dans notre échantillon (à savoir 1.2 l/j en moyenne ou 3.1 l/j, valeur du percentile 95), ces valeurs limites devraient être encore plus faibles. Il apparaît donc important de bien choisir les volumes d'eau correspondant à la population cible d'une démarche d'évaluation et de gestion du risque.

Cette étude a permis, de façon annexe, de cerner les principales causes déclarées d'un arrêt provisoire de consommation d'eau du robinet par les usagers, et de quantifier la proportion de personnes (9.6%) modifiant par leur comportement leur exposition au risque hydrique. Cette question peut se révéler pertinente dans certaines situations rencontrées en évaluation du risque hydrique. En effet, une bonne estimation de l'exposition des individus nécessite de prendre en compte les éventuelles modifications de comportement qui les conduiraient à se soustraire au risque. Ici, 57.7% (60/104) de ces arrêts sont liés à une diminution de la confiance du consommateur : dégradation des caractères de l'eau observée ou "attendue" du fait d'une pluviométrie importante par exemple.

En terme d'exposition aux polluants véhiculés par l'eau de boisson, l'estimation de leur teneur dans le compartiment hydrique est la donnée fondamentale. La quantification des

volumes ingérés par les individus peut sembler mineure, en raison de la plus faible variabilité des profils de consommation en population. Pourtant, tout particulièrement en matière de risques faibles, il est intéressant de disposer de données valides pour les populations faisant l'objet d'une démarche d'évaluation du risque ou d'études épidémiologiques. Par conséquent, les imprécisions qui pèsent sur les volumes réellement ingérés par les personnes peuvent avoir des conséquences non négligeables en termes de mesure des associations ou d'appréciation des impacts de santé publique. Pour ce qui est des risques chimiques encore plus que pour les risques microbiologiques (sur lesquels pèsent encore trop d'incertitudes pour donner lieu à des normes), l'hypothèse faite sur les volumes d'eau consommée (eau de boisson totale ou choix d'une autre catégorie d'eau, moyenne de la consommation ou percentile 95) participe de façon non négligeable à la valeur limite fixée pour tel ou tel autre contaminant hydrique. Il nous semble que l'établissement des normes de qualité chimiques et microbiologiques des eaux devrait donc prendre en compte la distribution de la consommation d'eau de boisson issue d'étude comme celles-ci, plutôt que des valeurs moyennes comme 2 l pour un adulte de 60 kg, afin de limiter pour le plus grand nombre les effets sanitaires indésirables des agents nocifs véhiculés par l'eau.

## **Conclusion**

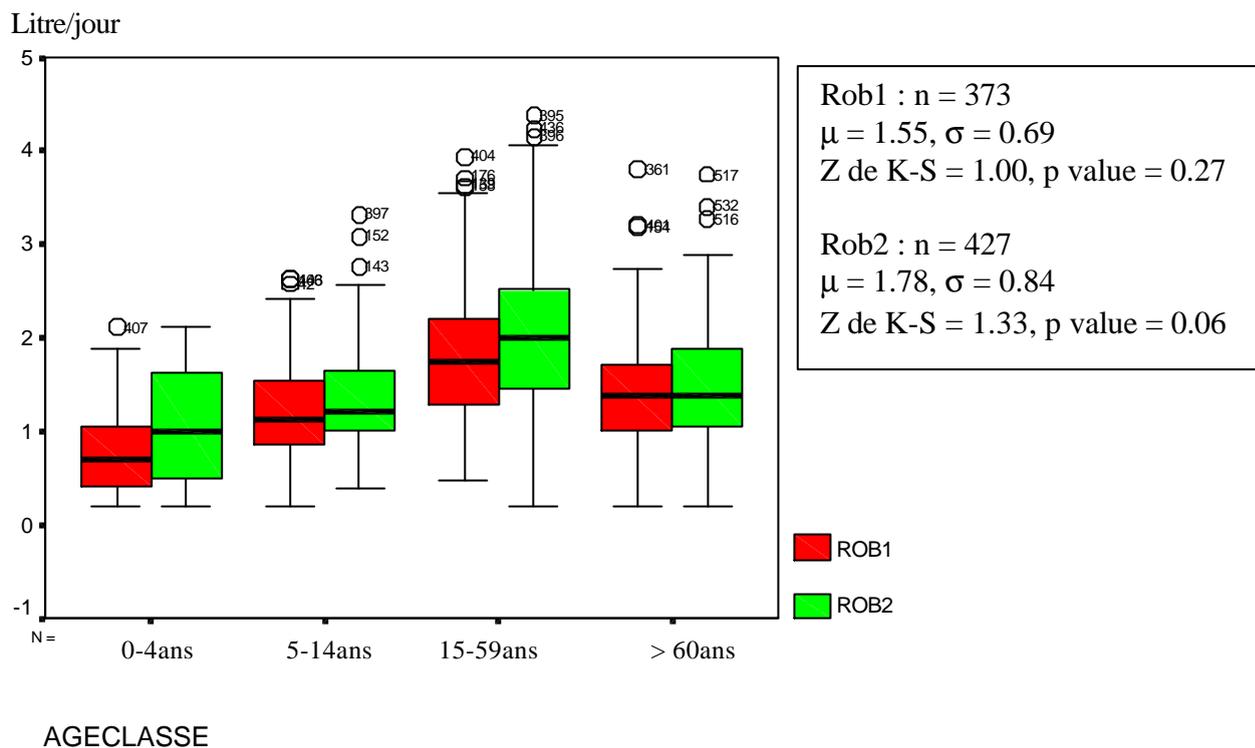
Les directives ou normes sur la qualité de l'eau de boisson, en ce qui concerne les substances chimiques ou les pathogènes infectieux, sont basées sur les hypothèses de quantité d'eau ingérée quotidiennement. C'est aussi le cas pour la démarche d'évaluation du risque hydrique ou certaines études épidémiologiques soucieuses de quantifier les expositions. Cette quantité a été fixée à 2 l/j par les autorités compétentes aux Etats-Unis, et cette valeur est reprise dans les recommandations de l'OMS qui servent de base pour l'élaboration des directives européennes sur la qualité de l'eau potable [4]. Au Canada, cette quantité a été fixée à 1.5 l/j [8]. Les études pour estimer les données de consommation d'eau restent trop peu nombreuses, en Amérique du nord mais aussi en Europe. Aussi, est-il intéressant de disposer, pour la France, de données récentes recueillies en population générale.

## **Bibliographie**

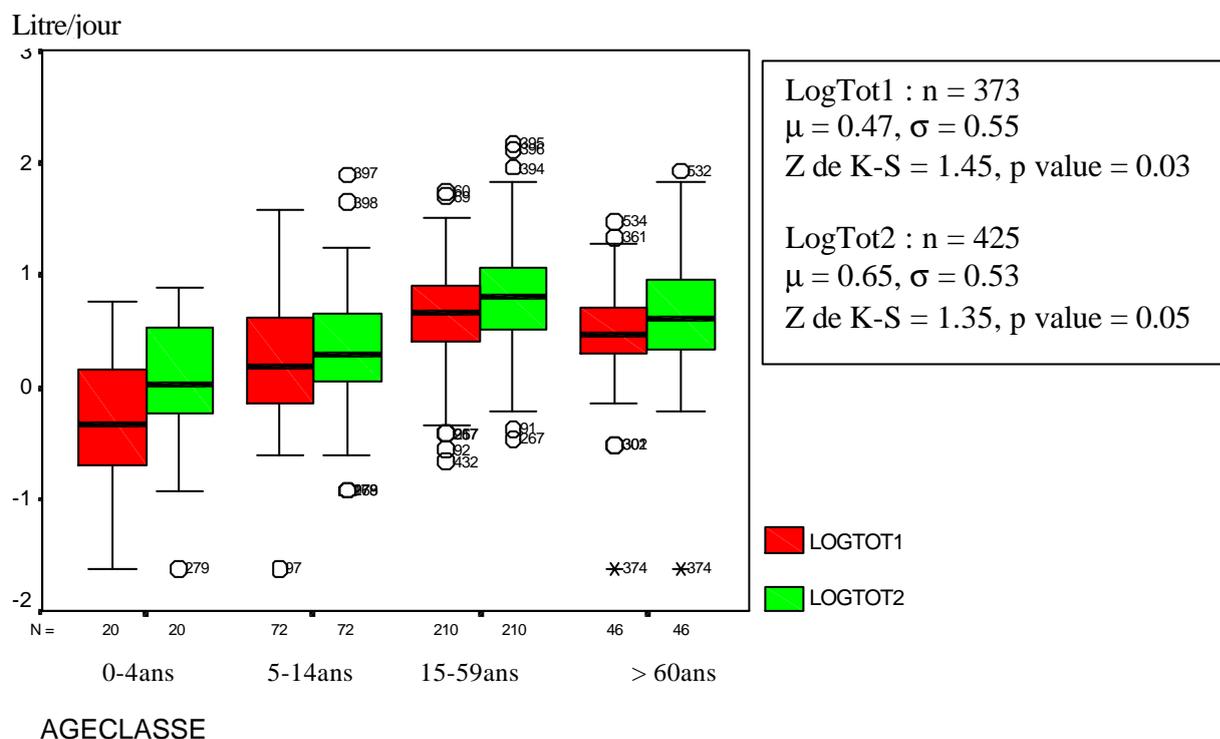
- [1]-Shimokura G.H., Savitz D.A. and Symanski E. Assessment of water use for estimating exposure to tap water contaminants. *Environmental Health perspectives*. 1998, 106, n° 2, 55-59.
- [2]-Armstrong B. K., White E. and Saracci R. *Principles of exposure measurement in epidemiology*. Oxford University Press. 1992.
- [3]-Roseburry A.M. and Burmaster D.E. Log Normal distributions for water intake by children and adults. *Risk Analysis*. 1992, 12, n°1, 99-104.
- [4]-OMS. *Guidelines for drinking-water quality. Recommendations. Vol 1*. 1993.
- [5]-National Academy of Sciences, *Drinking Water and health. Report by the safe drinking water committee*, National Academy of Sciences, Washington D.C. 1977.
- [6] Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O et al. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (E.M.I.R.A Study). *Wat Sci Tech* (in press).
- [7]-Burmaster D.E. Log Normal distributions for total water intake and tap water intake by pregnant and lactating women in the U.S. *Risk analysis*. 1998, 18, n°2, 215-219.
- [8]-Levallois P., Guerin N., Gingras S., Levesque B., Weber J.P., Letarte R. New patterns of drinking water consumption : Results of a pilot study. *The Sciences of the Total Environment*. 1998, 209, 233-241.
- [9]-Ershow A.G. and Cantor K.P. Total water and tap water intake in the United States : Population based estimates of quantities and sources. *Federation of American Societies for experimental biology*, MD. 1989.
- [10] Oglesby L, Rotko T, Krütli P et al. Personal exposure assessment studies may suffer from exposure-relevant selection bias. *J Expos Anal Environ Epidemiol*, 2000, 10 : 251-266.
- [11]-U.S. Department of Agriculture, *Nationwide Food Consumption survey 1977-1978 Individual data. Report I-2*, Hyattsville, MD. 1980.
- [12]-Meyer N., Helynck B., Le Goaster C., Kintz P., Michel A. Evaluation de l'imprégnation biologique d'une population exposée à une concentration élevée en arsenic dans les eaux de distribution, *Ferrette*, 1997. *Rev. Epidémi. et Santé Publ.*, 1999, 47, 315-321.
- [13]-Environmental Health Directorate. *Tap water consumption in Canada*. Ottawa : health Protection Branch, Minister of National Health and Welfare. 1981 : 82. IETD-80.

[14]-AFSSA. Note du 30 novembre 2000 à l'attention du Directeur Générale de la Santé relative à la présence d'atrazine et de ses métabolites dans l'eau de captage de Seine et Marne. [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr).

Grphe 1 : Distribution des données de consommation d'eau du robinet (Rob), enquête hiver (1) et printemps (2) 1999



Grphe 2 : Distribution des données de consommation d'eau de boisson totale (Tot) (transformation log-normale), enquête hiver (1) et printemps (2) 1999



Grphe 3 : Distribution des données de consommation d'eau embouteillée (Bout), enquête hiver(1) et printemps (2) 1999

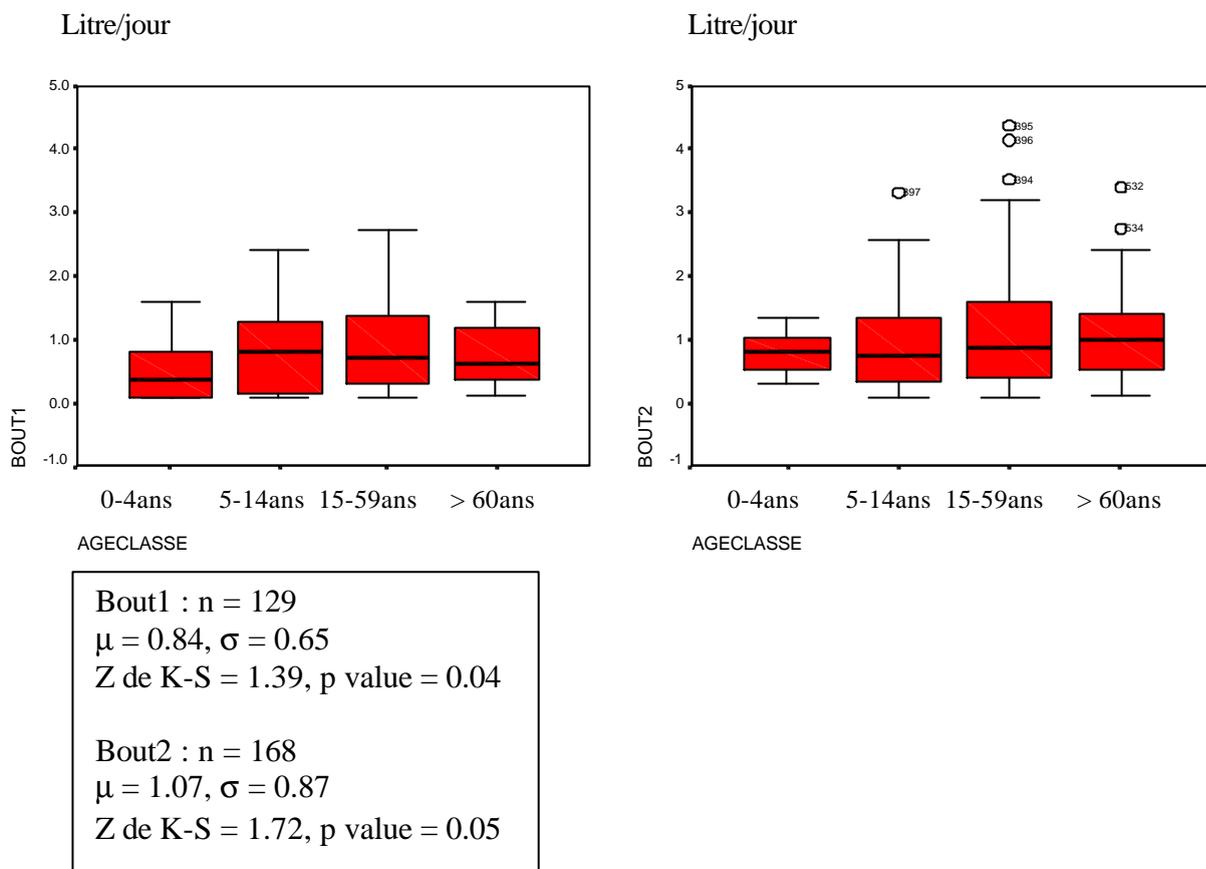


Tableau I : Rubriques du questionnaire et variables de consommation d'eau de boisson, exemple de valeurs pour un volontaire (l/j)

|                          | Eau du robinet |      |     |           | Hors commune | Totale | Eau embouteillée | Eau totale |
|--------------------------|----------------|------|-----|-----------|--------------|--------|------------------|------------|
|                          | Commune        | Pure | Add | Chauf Tot |              |        |                  |            |
| Consommation en semaine  | 1,6            | 0,8  | 0,8 | 3,2       | 0            | 3,2    | 0,6              | 3,8        |
| Consommation en week-end | 1,6            | 1,0  | 0,8 | 3,4       | 0            | 3,4    | 0,6              | 4,0        |
| Consommation d'enquête*  | 1,6            | 0,9  | 0,8 | 3,3       | 0            | 3,3    | 0,6              | 3,9        |

\* Application d'un système de pondération : consommation semaine d'enquête=5/7 consommation semaine + 2/7 consommation week end

Tableau II : Caractères socio-démographiques de l'ensemble de la population d'étude par rapport à la population générale

|                                    | Population d'étude<br>(n=534) | Population générale *<br>(n=34 275) | P value |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------|
| Sexe ratio                         | 0.96                          | 0.98                                | 0.9     |
| Classe d'âge                       | (en %)                        | (en %)                              |         |
| 0-4 ans                            | 6.9                           | 5.6                                 | 0.2     |
| 5-14 ans                           | 20.6                          | 14.1                                | <<0.001 |
| 15-59 ans                          | 60.4                          | 59.5                                | 0.7     |
| > 60 ans                           | 12.1                          | 20.9                                | <<0.001 |
| CSP de la personne de<br>référence | (en %)<br>(n=170)             | (en %)<br>(n=13 176)                |         |
| Agric. Exploit.                    | 1.2                           | 2.7                                 | 0.3     |
| Artis. Commerc.                    | 10.6                          | 8.7                                 | 0.4     |
| Cadre prof int sup.                | 12.9                          | 8.2                                 | 0.02    |
| Prof. Intermed.                    | 20.6                          | 12.8                                | 0.002   |
| Employé                            | 20.6                          | 7.9                                 | <<0.001 |
| Ouvrier                            | 5.9                           | 23.2                                | <<0.001 |
| Retraité                           | 24.1                          | 32.1                                | 0.03    |
| autres                             | 4.1                           | 4.4                                 | 0.9     |

\* Source : INSEE Rhône-Alpes (dans les communes de l'étude E.MI.R.A)

Tableau III : Consommation d'eau de boisson en litre par personne et par jour, par classe d'âge, hiver 1998-1999 et printemps 1999

|                           | Eau du robinet   |        |      |       | Eau embouteillée |        |        |       | Eau totale       |        |      |       |
|---------------------------|------------------|--------|------|-------|------------------|--------|--------|-------|------------------|--------|------|-------|
|                           | Percentiles      |        |      |       | Percentiles      |        |        |       | Percentiles      |        |      |       |
|                           | $\mu \pm \sigma$ | - P25  | P50  | P95-  | $\mu \pm \sigma$ | - P25  | P50    | P95-  | $\mu \pm \sigma$ | - P25  | P50  | P95-  |
| <b>Enquête Hiver</b>      | *                |        |      |       |                  |        |        |       |                  |        |      |       |
| <b>0-4 ans (n=22)</b>     | 0.85 ± 0.56      | - 0.40 | 0.70 | 1.90- | 0.15 ± 0.37      | - 0.00 | 0.00   | 0.80- | 0.93 ± 0.60      | - 0.50 | 0.70 | 2.10- |
|                           |                  |        |      |       | 0.57 ± 0.57      | - 0.10 | 0.40   | 2.10- |                  |        |      |       |
| <b>5-14 ans (n=78)</b>    | 1.25 ± 0.53      | - 0.90 | 1.15 | 2.40- | 0.17 ± 0.47      | - 0.00 | 0.00   | 1.30- | 1.42 ± 0.81      | - 0.90 | 1.20 | 3.10- |
|                           |                  |        |      |       | 0.83 ± 0.73      | - 0.10 | 0.85   | 2.40- |                  |        |      |       |
| <b>15-59 ans (n=225)</b>  | 1.75 ± 0.66      | - 1.30 | 1.70 | 2.80- | 0.33 ± 0.60      | - 0.00 | 0.00   | 1.90- | 2.07 ± 0.91      | - 1.50 | 1.90 | 4.10- |
|                           |                  |        |      |       | 0.90 ± 0.69      | - 0.30 | 0.70   | 2.10- |                  |        |      |       |
| <b>&gt; 60 ans (n=48)</b> | 1.46 ± 0.71      | - 1.00 | 1.40 | 3.20- | 0.34 ± 0.49      | - 0.00 | 0.00   | 1.40- | 1.78 ± 0.82      | - 1.30 | 1.60 | 3.6-  |
|                           |                  |        |      |       | 0.72             | 0.49   | - 0.30 | 0.60  | 1.60-            |        |      |       |
| <b>Total (n=373)</b>      | 1.55 ± 0.69      | - 1.10 | 1.50 | 2.70- | 0.29 ± 0.55      | - 0.00 | 0.00   | 1.60- | 1.83 ± 0.93      | - 1.20 | 1.70 | 3.70- |
|                           |                  |        |      |       | 0.85 ± 0.66      | - 0.30 | 0.70   | 2.10- |                  |        |      |       |
| <b>Enquête Printemps</b>  | **               |        |      |       |                  |        |        |       |                  |        |      |       |
| <b>0-4 ans (n=24)</b>     | 1.19 ± 0.85      | - 0.50 | 1.00 | 3.10- | 0.24 ± 0.41      | - 0.00 | 0.00   | 1.00- | 1.36 ± 0.87      | - 0.80 | 1.15 | 3.40- |
|                           |                  |        |      |       | 0.79 ± 0.32      | - 0.55 | 0.80   | 2.70- |                  |        |      |       |
| <b>5-14 ans (n=87)</b>    | 1.44 ± 0.67      | - 1.00 | 1.20 | 2.80- | 0.27 ± 0.63      | - 0.00 | 0.00   | 1.50- | 1.71 ± 1.05      | - 1.10 | 1.50 | 3.50- |
|                           |                  |        |      |       | 0.98 ± 0.87      | - 0.35 | 0.70   | 2.60- |                  |        |      |       |
| <b>15-59 ans (n=259)</b>  | 1.99 ± 0.81      | - 1.40 | 2.00 | 3.40- | 0.43 ± 0.79      | - 0.00 | 0.00   | 2.20- | 2.42 ± 1.20      | - 1.70 | 2.20 | 4.80- |
|                           |                  |        |      |       | 1.10 ± 0.92      | - 0.40 | 0.90   | 3.10- |                  |        |      |       |
| <b>&gt; 60 ans (n=57)</b> | 1.55 ± 0.87      | - 1.10 | 1.40 | 3.40- | 0.66 ± 0.83      | - 0.00 | 0.30   | 2.40- | 2.20 ± 1.25      | - 1.40 | 1.80 | 4.80- |
|                           |                  |        |      |       | 1.13 ± 0.81      | - 0.50 | 1.00   | 2.70- |                  |        |      |       |
| <b>Total (n=427)</b>      | 1.78 ± 0.84      | - 1.20 | 1.70 | 3.30- | 0.42 ± 0.75      | - 0.00 | 0.00   | 2.10- | 2.19 ± 1.20      | - 1.40 | 1.90 | 4.50- |
|                           |                  |        |      |       | 1.07 ± 0.87      | - 0.40 | 0.90   | 2.70- |                  |        |      |       |

\* valeurs pour les personnes ayant une consommation non nulle d'eau embouteillée (n=129)

\*\* valeurs pour les personnes ayant une consommation non nulle d'eau embouteillée (n=168)

Tableau IV : Répartition des moyennes journalière, par classe d'âge, des différentes formes de consommation d'eau du robinet en l/j (moyenne  $\pm$  écart-type)

|                           | Consommation dans la commune<br>du domicile    |   |  | Consommation<br>extérieure à la<br>commune du<br>domicile | Consommation<br>totale d'eau du<br>robinet |
|---------------------------|--|---|--|---|--|
|                           | Consommation<br>directe au robinet<br>(froide) | Consommation<br>autre<br>(additionnée,<br>chauffée ...) |  |   |  |
| <b>Enquête hiver</b>      |  |   |  |   |  |
| <b>0-4 ans (n=22)</b>     | 0.50 $\pm$ 0.35                                | 0.18 $\pm$ 0.40   |  | 0.12 $\pm$ 0.30   | 0.85 $\pm$ 0.56                            |
| <b>5-14 ans (n=78)</b>    | 0.75 $\pm$ 0.38                                | 0.36 $\pm$ 0.51   |  | 0.14 $\pm$ 0.27   | 1.25 $\pm$ 0.53                            |
| <b>15-59 ans (n=225)</b>  | 0.80 $\pm$ 0.48                                | 0.63 $\pm$ 0.58   |  | 0.28 $\pm$ 0.39   | 1.75 $\pm$ 0.66                            |
| <b>&gt; 60 ans (n=48)</b> | 0.78 $\pm$ 0.50                                | 0.58 $\pm$ 0.61   |  | 0.05 $\pm$ 0.24   | 1.46 $\pm$ 0.71                            |
| <b>Total (n=373)</b>      | 0.77 $\pm$ 0.46                                | 0.54 $\pm$ 0.60   |  | 0.21 $\pm$ 0.36   | 1.55 $\pm$ 0.69                            |
| <b>Enquête printemps</b>  |  |   |  |   |  |
| <b>0-4 ans (n=24)</b>     | 0.79 $\pm$ 0.60                                | 0.29 $\pm$ 0.46   |  | 0.05 $\pm$ 0.19   | 1.19 $\pm$ 0.85                            |
| <b>5-14 ans (n=87)</b>    | 0.90 $\pm$ 0.44                                | 0.38 $\pm$ 0.56   |  | 0.09 $\pm$ 0.23   | 1.44 $\pm$ 0.67                            |
| <b>15-59 ans (n=259)</b>  | 0.97 $\pm$ 0.62                                | 0.70 $\pm$ 0.63   |  | 0.30 $\pm$ 0.46   | 1.99 $\pm$ 0.81                            |
| <b>&gt; 60 ans (n=57)</b> | 0.67 $\pm$ 0.55                                | 0.72 $\pm$ 0.65   |  | 0.11 $\pm$ 0.37   | 1.55 $\pm$ 0.87                            |
| <b>Total (n=427)</b>      | 0.90 $\pm$ 0.58                                | 0.61 $\pm$ 0.62   |  | 0.22 $\pm$ 0.41   | 1.78 $\pm$ 0.84                            |

Tableau V : Estimation de la consommation d'eau de boisson après standardisation sur la structure d'âge de la population française

|                   | Eau du robinet           | Eau embouteillée *      | Eau totale               |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                   | Moyenne (écart-type)     | Moyenne (écart-type)    | Moyenne (écart-type)     |
|                   | [IC95%]                  | [IC95%]                 | [IC95%]                  |
| Enquête hiver     | 1.58 (0.434) [0.73-2.43] | 0.84 (0.440) [0.0-1.70] | 1.87 (0.589) [0.71-3.02] |
| Enquête printemps | 1.79 (0.533) [0.74-2.83] | 1.08 (0.593) [0.0-2.24] | 2.23 (0.787) [0.69-3.77] |

\* volontaires ayant une consommation non nulle d'eau embouteillée

Tableau VI : Fréquence des arrêts de consommation d'eau du robinet en fonction du réseau d'alimentation en eau potable

|                            | Nature de la ressource            | Traitement de désinfection * | Nombre de volontaires concernés par au moins 1 arrêt |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| <b>Groupe 0</b><br>(n=122) | Nappe phréatique<br>Forage        | aucun                        | 6 (4.9 %)  |
| <b>Groupe 1</b><br>(n=100) | Source.<br>Captage karstique      | Chlore +                     | 11 (11 %)  |
| <b>Groupe 2</b><br>(n=100) | Source<br>Captage en moraine      | Chlore -/+                   | 18 (18 %)  |
| <b>Groupe 3</b><br>(n=222) | Lac de surface<br>Pompage à -30 m | Chlore +                     | 17 (7.7 %)   |
| <b>Total</b><br>(n=544)    | /                                 | /                            | 52 (9.6 %)   |

\*Chlore (-) = < Seuil de détection de 0.02 mg/l; chlore (+) = compris entre 0.02 et 0.05 mg/l

Tableau VII : Comparaison des consommation d'eau de boisson (l/j) avec d'autres études

|   | Eau consommée                              |                                       |                           |                       |
|---|--|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
|   | Eau consommée pure (robinet/ embouteillée) | Eau modifiée (additionné ou chauffée) | Eau d'origine alimentaire | Eau de boisson totale |
| Etude canadienne<br><i>Environmental Health Directorate, 1981</i> | 0.40                                       | 0.88                                  | 0.06                      | 1.34                  |
| Etude U.S<br><i>Ershow and Cantor, 1989</i>                       | 0.67                                       | 0.60                                  | 0.09                      | 1.37                  |
| Etude Quebec (20-64 ans)<br><i>Levallois, 1998</i>                | 0.82                                       | 0.68                                  | 0.12                      | 1.62                  |
| Etude Grenobleise (E.M.I.R.A.)                                    | (hiver)= 1.04<br>(printemps)=1.32          | 0.54<br>0.61                          | Non estimée               | 1.83<br>2.19          |

### **3.8-Article IV : Implication des astrovirus hydriques dans les troubles digestifs aigus (étude E.MI.R.A)**

#### **Implication of waterborne astrovirus in acute digestive conditions (E.MI.R.A study)**

L. Gofti-Laroche <sup>1</sup>, B. Gratacap-Cavallier <sup>2</sup>, D. Demanse <sup>1</sup>, O. Genoulaz <sup>2</sup>, J-M Seigneurin <sup>2</sup>, D. Zmirou <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Public Health Laboratory, Grenoble University Medical School, France

<sup>2</sup> Molecular Medical Virology Laboratory, Grenoble University Hospital, France

Contact for information : Leïla Gofti-Laroche, Laboratoire de Santé Publique, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38 706 La Tronche Cedex, France. Tel : + 33 4 76 63 88 15; Fax : + 33 4 76 51 01 58; e-mail : [leila.gofti@ujf-grenoble.fr](mailto:leila.gofti@ujf-grenoble.fr)

#### **Abstract**

With rotavirus and Small Round Structured Viruses (SRSV), astroviruses are now recognized as the most important etiologic agents of viral gastro-enteritis in all age groups. This work aims to assess health risks attributable to astrovirus conveyed by drinking water in a non epidemic context. Between October 1998 and June 1999, the E.MI.R.A (Epidemiology and Microbial Risk Assessment) study combined a daily epidemiological follow-up of digestive morbidity among a panel of 544 volunteers supplied by 4 French public water systems characterized by their raw water vulnerability, and a microbiological surveillance of drinking water. Cases of acute digestive conditions (ADC) were enumerated through weekly telephone calls. Compliance with bacterial criteria, virological and parasitological quality of tap water, were assessed monthly. Additional water samples were collected if incidence of digestive morbidity increased. The relationship between incidence of acute digestive conditions during a 7 days period centered about the water sampling day, and astrovirus RNA prevalence in drinking water was modeled by regression techniques, taking into account several confounders. Presence of astrovirus RNA was associated with an increased risk of ADC : RR=1.51 (95%CI=[1.17-1.94]). This result pinpoints the role of waterborne astrovirus in the endemic level of digestive morbidity in the general population and underscore the needs for surveillance of enteric viruses, or of relevant surrogates, in drinking water. **Keyword** : *Astrovirus, digestive morbidity, drinking water, epidemiological study*

## **Introduction**

Waterborne infectious diseases dramatically decreased during the 20<sup>th</sup> century, especially in developed countries. However, they did not disappear completely and residual risks still persist, including when drinking water complies with the current microbial (bacterial) criteria (Payment, 1991; Zmirou, 1995). In the two past decades, mostly in the North American continent and in the United Kingdom, protozoa and viruses emerged throughout water supplies as a new threat for public health (Lisle, 1995; LeBaron, 1999). Many outbreaks of gastroenteritis occurred, sometimes involving a large fraction of the exposed population (as during the Milwaukee outbreak), and often, despite a well conducted water treatment (Goldstein, 1996). Viruses and protozoa are more infectious and resistant in the environment, and to disinfection, than bacterial pathogens or indicators. It is now reckoned that current bacterial criteria are poor predictors for this "new" pathogens, and that additional indicators and measures are needed for their surveillance and control (Nicand, 1998).

Data on the magnitude and the sources of waterborne viruses are scarce, while more than 110 types of enteric viruses are capable of environmental transmission. Authors recognize that in many ways, viruses are the most poorly understood area of research on waterborne disease (Rose, 1986; Ford, 1999). With Norwalk-like viruses, and excluding rotaviruses, astroviruses are now recognized as the most important etiologic agents of viral gastroenteritis (Foley, 2000; Putzker, 2000). There are at least 7 human astrovirus (HAstV) serotypes (Belliot, 1997a) which are causative agents of digestive diseases in all age-groups. Infections occur mainly in childhood (Astrovirus home page; Putzker, 2000), but astroviruses have been also associated with gastroenteritis in adults, elderly, and immunocompromised patients (Abad, 1997; Belliot, 2001; Denis, 1997; Belliot, 1997a). Like rotavirus, astrovirus infections peak during the winter months (Nicand, 1998; Astrovirus home page), and also in spring (Denis, 1997); however, HAstV infections are clinically milder than rotavirus infections (Kurtz, 1979; Lopez, 2000; Walter, 2000). The incubation period is between 24 and 36 hours. Diarrhea is observed only among 30% of infected patients, with complete recovery within 48 hours, and associated symptoms are nausea/vomiting, abdominal pain, and fever (Astrovirus home page). In contrast with this growing evidence, astrovirus is not routinely screened for in stool samples, nor in environmental water samples (Belliot, 2001). Although transmission is probably mostly

person-to-person, exposure through the fecal-oral route from food or water sources might be non negligible (Walter, 2000). The role of contaminated water is often invoked by authors (Denis, 1997; Le Baron, 1999) but it is rarely investigated. Astrovirus were detected in water from an area where an outbreak of gastroenteritis had occurred (Pinto, 1996); but data on environmental sources, and particularly on health impact of waterborne astrovirus are lacking. About 14 to 40% of gastrointestinal illnesses may be attributable to tap water meeting current standards (Payment, 1997). Despite progress in surveillance of gastroenteritis infections throughout the past two decades, the proportion of cases with unknown etiology lies between 25 and 55% (Denis, 1997). Most authors ascribe a large part of these infections to enteric viruses (Blacklow, 1991; Durepaire, 1995), but, the health impact of emerging pathogens through drinking water is not accurately assessed to date.

This work aimed at assessing the potential implication of astrovirus in drinking water on the incidence of acute digestive conditions among a panel of volunteers; it was a part of a prospective study on virological and parasitical hazards conveyed through drinking water, the E.M.I.R.A study.

## **Materials and Methods**

### ***Epidemiological survey***

The design of the E.M.I.R.A study was also described in detail elsewhere (Gofti-Laroche, in press; Gofti-Laroche L, Joret JC, Demanse D, Zmirou D. Assessment of health risks associated with the parasitical quality of drinking water (E.M.I.R.A study) (submitted)). Briefly, volunteer households were recruited among French rural communities supplied by 4 public water systems chosen for their raw water vulnerability and exposed to livestock and/or community sewage. Based on the results of the water quality control by local health authorities, tap water of the 1<sup>st</sup> group was expected to comply always with the bacterial standards, and tap water of the 3 other groups complied for more than 80% of samples. In all but the first group which was untreated, water was disinfected by chlorine only. Volunteers included in the study were regular tap water consumers, without chronic condition. Each participating family completed a self-administrated daily questionnaire whereby all health problems of household members were registered. These data were retrieved by telephone calls, following a daily 1/5<sup>th</sup> sampling procedure. This surveillance scheme allowed a continuous description of digestive morbidity incidence, and outbreaks detection. An "alert"

threshold was defined as the occurrence of 2 cases of acute digestive conditions in the same community (but not in the same household) during the same 48 h. A case of acute digestive conditions (ADC) was defined as an episode of abdominal pain, nausea, vomiting and/or diarrhoea; a case of diarrhoeic episode (DE) was an episode of diarrhoea with at least another digestive condition or fever; and a case of gastro-enteritis (GE) was an episode of diarrhoea with at least another objective sign (fever or vomiting). Volunteers were also asked about their drinking water consumption through detailed questionnaires.

### ***Virological water quality survey***

Raw and tap water samples (4.5 L) were analyzed monthly to characterize the virological quality of tap water in a non epidemic context (figure 1). In addition, tap water samples were collected daily in each group by a local sentinel in sterilized flasks of glass (with sodium thiosulfate to neutralize residual chlorine), and stored at 4°C for 3 to 5 days. In case an increased incidence of ADC was detected by the phone surveillance, the samples representing water quality of the day of the suspected outbreak, and the two days before, were analyzed. This period encompasses the usual lag for viral infections and diseases, particularly for astrovirus. Sample concentration was performed with the Minitan® system (Millipore) for tangential ultrafiltration. The Centriprep® concentrator (Amicon) was used for the second concentration, and the samples concentrated to about 0.5 mL. Total RNA extraction was performed on 300 µL of concentrate water using high pure viral nucleic acid kit (Roche Meylan). The RNA pellet was resuspended in 50 µL of diethyl pyrocarbonate-treated water. For the RT-PCR, 10 µL of extracted RNA was added to an RT mixture including 10 pmol of RT primer MON 348 and the mixture was incubated for 1 h at 42°C. Ten µL of each cDNA product were mixed with 40 µL of the PCR reaction mixture following by 35 cycles PCR. Primers MON 340 (5' CGT CAT TAT TTG TTG TCA TACT 3') and MON 348 (5' ACA TGT GCT GCT GTT ACT ATG 3') used for PCR are located in the open reading frame 1a (ORF1a) which is able to detect the seven astrovirus serotypes, and yield a 289 bp amplicon. The final RT-PCR products were visualised by ethidium bromide staining. After transfer, hybridization was performed with a specific internal 32 P labeled probe AGT CAG GGG TGA GAG TTG GAG TCA AC. Negative and positive control samples were included in the experiment. The control strain of astrovirus was the HastV1. The detection limit was estimated to be 1 TCID<sub>50</sub> L<sup>-1</sup> (50% tissue culture infectious dose). It is important to note that these assays do not allow to record viability nor infectivity of detected viruses.

### ***Statistical analysis***

Due to the longitudinal design of the study, with repetitive measurements on the same subjects, the relationship between incidence of ADC and presence of astrovirus RNA was modeled using Generalized Estimating Equations (GEE) (Liang, 1986; Zeger, 1986). To improve exposure ascription, association between water quality and morbidity was tested for different time units (more or less than 3 days around the corresponding water sample; more or less 7 days, and 15 days). This paper deals with the most restricted time unit, thus discarding 63.6% of digestive morbidity data, because it resulted in better associations, suggesting exposure misclassification for longer time units. Incidence of ADC was modeled, rather than DE or GE, because, while less specific, it is more sensitive a measure of acute digestive morbidity. Logistic regression was run to control for potential confounders and effect modifiers. Statistical analyses were performed using Excel®, Epi-info, SPSS®, Oswald 3.4 and S-plus 4.0.2 software-s.

### **Results (table I)**

The E.MI.R.A panel included 544 volunteers, with 27.5% children (0-14 years old), and 12.1% subjects over 60 years old, distributed across the 4 groups. Across 92 186 person-days of observations, 712 episodes of ADC were declared, 105 episodes of DE, and 46 episodes of GE. Only one true outbreak occurred, in group 3, involving 17 volunteers, with a peak February the 17<sup>th</sup>. Crude incidence rates of ADCs and EDs differ significantly across groups ( $p < 0.01$  for the two morbidity categories) : group 3 exhibited the greater rates, followed by groups 1, 4, and finally group 2.

During the microbial water survey, 68 water samples were analyzed for astrovirus RNA. Eight routine sampling runs were performed between November 1998 and June 1999, providing 24 raw water samples, and 32 tap water samples; 12 additional tap water samples were collected during 4 epidemic alerts (the true outbreak, and 3 alerts that aborted). Astrovirus was found in 7/24 of raw water samples and 1/44 of tap water samples. No astrovirus was found in the 1<sup>st</sup> group, while in the 3 other groups the proportion of positive water samples for astrovirus RNA was respectively 1/19, 2/19 and 5/19. During the true outbreak, astrovirus was found in raw and tap samples collected the peak day, and none in the following days samples.

Occurrence of ADC was modeled according to microbial water quality and several covariates. Positive samples for astrovirus RNA were associated with a significant increase in digestive morbidity incidence, over and above the effect of *Giardia* cysts : the relative risks for astrovirus was 1.51 (95% CI=[1.17-1.94]) (table II).

## **Discussion**

About 30 to 40% of infectious diarrhea in developed countries may be attributable to the numerous groups of enteric viruses (Denis, 1997). Most of them are fastidious viruses and classical methods such as cell culture are difficult to use. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is an extremely sensitive method to detect astrovirus in stool or environmental samples. It is now the method most frequently used to detect astrovirus in the environment, but also enterovirus, rotavirus and calicivirus. However, if PCR techniques are efficient for virus detection, they fail to evaluate viral infectivity, in particular, after disinfection, which is of critical relevance in environmental virology and virological health impact assessment (Abad, 1997; Nicand, 1998). It was shown in previous experiments, that viruses inactivated by free chlorine were still detectable by molecular techniques (Abad, 1997). Thus, molecular techniques might overestimate the true exposure of volunteers. However, non enveloped enteric viruses are generally considered resistant to many disinfection processes (Glass, 1996). Moreover, recent data on astrovirus survival in chlorinated drinking water suggest that their inactivation requires at least 0.5-1 mg/L of free chlorine (Abad, 1997), and US-EPA guidelines for municipal water systems recommend residual chlorine concentration of greater than or equal to 0.2 mg/L (Le Baron, 1990). In our study, levels of residual chlorine never exceeded 0.02 mg/L. Thus, we hypothesize that this low chlorine level was insufficient to inactivate astroviruses, and so, we combined raw water and tap water data to characterize exposure. The assays used to assess astrovirus in water had also been applied for rotavirus and enterovirus, and showed satisfactory results for environmental samples (Soule, 2000). In our study, astrovirus RNA was found in 11.6% (8/68) of the samples : once in raw and tap water samples, that were collected during the epidemic episode in group 3 (supplied by a well located in a vulnerable watershed), and five times in raw water samples of group 4 (supplied by a surface water surrounded by farm and human activities).

There are very few studies on health impacts of waterborne astrovirus. Most involved astrovirus detection in stool samples of diarrheic subjects, or studied seroprevalence. This virus was detected in 6.3% of stools samples from children (< 18 months old) prospectively monitored for diarrhea in Mexico city (Walter, 2001). Astrovirus infection may also occur among young adults (Belliot, 1997a). In Ireland, 7% of positive stools samples were positive for astrovirus among paediatric patients (Foley, 2000); the figure was 8.9% in Melbourne (Mustapha, 2000). Unfortunately, in our study, no data is available on the astrovirus human serotype for lack of genetic material. Water contamination by astrovirus was repetitively found between November and May, which is in accord with the literature that shows a seasonal trend of astrovirus prevalence in the environment and astrovirus infection, with a peak in winter and spring (Miossec, 2000; Putzker, 2000). Presence of astrovirus RNA also showed a greater association with ADC than the other viruses that were analyzed or protozoa. However, no attempt was made to detect astrovirus in feces of the sick volunteers. The incubation period for astrovirus is between 24 and 36 hours, with illness typically lasting 1-4 days (Denis, 1997). Pathogenicity is relatively low, at least among adults, while children might exhibit more severe effects (Kurtz, 1979). Gastrointestinal symptoms are non specific (Nicand, 1998; LeBaron, 1999; Lopez, 2000). These features are consistent with the symptoms that we included in our ADC definition, and with the +/- 3 days lag chosen for the statistical analysis. The E.M.I.R.A panel included young children, elderly and pregnant women, but no individual with chronic diseases. Secondary transmission and characteristics of immunity could not be accommodated in our model because little is known in these fields (LeBaron, 1999). Secondary transmission of viruses might be non negligible through person to person contacts. Also, the issues such as the level of immunity that might be induced by prior astrovirus infection, or the impact of astrovirus infection on susceptible subjects remain to be explored.

Because astrovirus seem to be frequently found in water supplies, because its detection using cell culture or combined culture RT-PCR (Chapron, 2000), is easier than for rotavirus and calicivirus (including in cell culture), because RT-PCR techniques are able to detect only human specific serotypes, and because it is associated with non specific and often mild digestive morbidity, astrovirus may be a good candidate for surveillance of drinking water quality. However, other criteria should also be considered in order to assess the relevance of astrovirus surveillance for viral quality characterization, among them are the level of

prevalence in water, and the degree of correlation with other viral pathogens. Further research is thus needed.

## **Conclusion**

Transmission of gastroenteritis associated with enteric viruses, such as astrovirus, via contaminated drinking water is a relevant public health concern. Now, technical tools for enteric viruses detection in environmental samples are still under-developed for field surveillance. Incidence of astrovirus infection that was reported in the literature highlights the need for improved surveillance of astrovirus among target populations, and for development of rapid detection systems amenable to clinical laboratories, but also to water laboratories, in order to increase our knowledge and control capabilities of viruses sources. This work suggests an implication of astrovirus conveyed through drinking water in the endemic mode incidence of acute digestive conditions in the general population. These results might not extend to all situations however, because the E.MI.R.A study water systems – that were chosen for their raw vulnerability - are not representative of all water supplies or of the average drinking water quality in France.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Central Laboratory of *Générale des Eaux* (Vivendi Waters), the French Ministry of Environment (research program "Health and Environment"), and the French Water Agencies. The authors thank Pr Ph. Hartemann, from the Department of Environment and Public Health of Nancy University, L. Belleville and A. Guilloud, from the Local Services of the Ministry of Health, JC Joret, MR De Roubin, and F Poty, from the Central Laboratory of *Générale des Eaux* (Vivendi Waters), Dr P. Chevallier and Mrs Bouvier, from the Regional Laboratory of Water Surveillance, for their technical assistance. The authors are especially grateful to Eric Da Silva, from CAREPS Grenoble University Hospital, who was in charge of telephone calls. Acknowledgements are extended to the mayors of the E.MI.R.A communities for their pleasant collaboration, and to all the volunteers for their faithful participation.

## **References**

1. Abad FX, Pinto RM, Villena C, Gajardo R, and Bosch A. 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* **63** (8) : 3119-3122.
2. Astrovirus home page. <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Astroviridae/>
3. Belliot G, Laveran H, and Monroe S. 1997a. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virology.* **51** : 101-106.
4. Belliot G, Laveran H, and Monroe SS. 1997b. Detection and genetic differentiation of human astroviruses : phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol.* **142** : 1323-1334.
5. Belliot GM, Fankhauser RL and Monroe SS. 2001. Characterization of Norwalk-like viruses and astroviruses by liquid hybridization assay. *J Virol Methods.* **91** (2) : 119-130.
6. Blacklow NR, and Greenberg HB. 1991. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med.* **325** : 252-264.
7. Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, and Margolin AB. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the Information Collection Rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.* **66** (6) : 2520-2525.
8. Denis F, Barriere E, Venot C *et al.* 1997. Virus et infections gastro-intestinales. *Ann Biol Clin.* **55** : 275-287.
9. Durepaire N, Pradie MP, Ploy MC *et al.* 1995. Les adénovirus dans les prélèvements de selles en milieu hospitalier : comparaison avec les principaux agents des gastroentérites (rotavirus, Campylobacter, Salmonella). *Pathol Biol.* **43** : 601-610.
10. Foley B, O'Mahony J, Morgan SM, Hill C, and Morgan JG. 2000. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J Clin Virol.* **17** (2) : 109-117.
11. Ford TE. 1999. Microbiological safety of drinking water : US and global perspectives. *Environ Health Perspectives.* **107**, suppl 1 : 191-206.
12. Glass RI, Kilgore PE, Holman RC *et al.* 1996. The Epidemiology of rotavirus diarrhea in the United-States : surveillance and estimates of disease burden. *J. Infect. Dis.* **174** (suppl 1) : S5-11
13. Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavailler B, Genoulaz O *et al.* A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water [EMIRA Study]. *Water Sc Technol* (in press).

14. Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O *et al.* 1996. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the art water treatment. *Ann Intern Med.* **124** : 459-468.
15. Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, and Reed S. 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virology.* **3** : 221-230.
16. Le Baron CW, Furutan NP, Lew JF *et al.* 1999. Viral agents of gastroenteritis : public health importance and outbreak management. *MMWR.* **39** (RR-5) : 1-24.
17. Liang K.Y and Zeger S.L. 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika.* **73** : 13-22.
18. Lisle J.T and Rose J.B. 1995. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and the UK : a mini review. *J Water SRT-aqua.* **44** : 103-117.
19. Lopez L, Castillo FJ, Ferrandez MA *et al.* 2000. Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19** : 545-547.
20. Miossec L, Le Guyader F, Haugarreau L, and Pommepuy M. 2000. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastro-enteritis epidemics in human coastal population. *Rev Epidémiol Santé Pub. Suppl 2* : 2S62-71.
21. Mustapha H, Palombo EA and Bishop RF. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastro-enteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol.* **38** (3) : 1058-1062.
22. Nicand E, Teyssou R, and Buisson Y. 1998. Le risque fécal viral en 1998. *Virologie.* **2** (2) : 103-116.
23. Payment P, Siemiatycki J, Richardson L, Renaud G, Franco E, and Prevost M. 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effect due to the consumption of drinking water. *Int J Environ Health Res.* **7** : 5-31.
24. Pinto RM, Abad FX, Gajardo R, and Bosch A. 1996. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol.* **62** (5) : 1811-1813.
25. Putzker M, Sauer H, Kirchner G, Keksel O, and Malic A. 2000. Community acquired diarrhea : the incidence of astrovirus infections in Germany. *Clin Lab.* **46** (5-6) : 269-273.
26. Rose JB, and Gerba CP. 1986. A review of viruses in treated drinking water. *Curr Pract Environ Sci Eng.* **2** : 119-141.
27. Soule H, Genoulaz O, Gratacap-Cavallier B, Chevallier P, Liu JX and Seigneurin JM. 2000. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction : an efficient

process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Wat. Res.* **34** (3) : 1063-1067.

28. Walter JE and Mitchell DK. 2000. Role of astrovirus in childhood diarrhea. *Curr Opin Pediatr.* **12** (3) : 275-279.

29. Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML *et al.* 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a peri-urban community of Mexico city. *J Infect Dis.* **183** (5) : 681-686.

30. Zeger S.L and Liang K.Y. 1986. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics.* **42** : 121-130.

31. Zmirou D, Rey S, Courtois X *et al.* 1995. Residual health risk after simple chlorine treatment of drinking water in small community systems. *Eur J Publ Health.* **5** : 75-81.

*Table I : Epidemiological and astrovirus main results*

|         | Type of resource     | Number of subjects | ADC* incidence rate (person-year) | Astrovirus Raw water | RNA Tap water |
|---------|----------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------|
| Group 1 | Groundwater          | 122                | 3.1                               | /                    | 0/11          |
| Group 2 | Quarstic groundwater | 100                | 2.0                               | 1/8                  | 0/11          |
| Group 3 | Unprotected well     | 100                | 4.7                               | 1/8                  | 1/11          |
| Group 4 | Lake                 | 222                | 2.3                               | 5/8                  | 0/11          |
| Total   |                      | 544                | 2.8                               | 7/24                 | 1/44          |

\*ADC : acute digestive conditions

*Table II : Relative risks (RR) and confidence intervals (CI95%) provided by the final model*

|                                 | Variable*             | RR   | CI95%       |
|---------------------------------|-----------------------|------|-------------|
| Enterovirus                     | dummy variable        | 0.60 | [0.45-0.80] |
| Astrovirus                      | dummy variable        | 1.51 | [1.17-1.94] |
| <i>Giardia</i> 10-20 cysts/100L | quantitative variable | 1.19 | [0.96-1.48] |
| <i>Giardia</i> > 20 cysts/100L  | quantitative variable | 1.24 | [1.06-1.45] |

\* The final GEE model included the following variables : community, age, individual tap water intake, compliance with bacterial criteria, *Giardia* counts, enterovirus RNA, and astrovirus RNA. *Cryptosporidium* counts and rotavirus did not provide significant association

### 3.9-Article V : Evaluation des risques sanitaires associés à la qualité parasitologique de l'eau de boisson (étude E.MI.R.A)

#### ASSESSMENT OF HEALTH RISKS ASSOCIATED WITH THE PARASITICAL QUALITY OF DRINKING WATER (E.MI.R.A STUDY).

L. Gofiti-Laroche<sup>1</sup>, J-C. Joret<sup>2</sup>, D. Demanse<sup>1</sup>, D. Zmirou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Public Health Laboratory of Grenoble University Medical School, France

<sup>2</sup> Central Laboratory of the Générale des Eaux (Vivendi), St Maurice, France

Contact for information : Leïla Gofiti-Laroche, Laboratoire de Santé Publique, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France. Tel : + 33 4 76 63 88 15; Fax : +33 4 76 51 01 58; e-mail : [leila.gofiti@ujf-grenoble.fr](mailto:leila.gofiti@ujf-grenoble.fr)

**Objective :** To assess risks due to protozoa in drinking water in a non epidemic context.

**Methods :** The E.MI.R.A study, carried out between October 1998 and June 1999 in the French Alps, combined a daily epidemiological follow-up of digestive morbidity among a panel of 544 volunteers, and a monthly microbiological surveillance of tap water. Volunteers were supplied by 4 public water systems, one with non treated groundwater, the others with simple chlorine treatment, in spite of raw water vulnerability. In addition to bacterial and virological analyses, parasitological quality of water was assessed using Envirochek sampling capsule for *Giardia sp.* cysts and *Cryptosporidium sp.* oocysts, followed by concentrate purification and immunofluorescence assay for detection. The relationship between incidence of acute digestive conditions and concentrations of protozoa was modeled using Generalized Estimating Equations (GEE). **Results :** 712 cases of ADC occurred during the study period, and 36 tap water samples were collected. 11 out of 36 samples were positive for at least one protozoa : 8 for *Giardia*, and 3 for *Cryptosporidium*. 10 positive samples out of 11 complied with bacterial criteria. The final GEE model included concentration of *Giardia* cysts, community, age, daily tap water intake, presence of bacterial indicators, of enterovirus and astrovirus markers; *Cyptosporidium* data were too scarce for analysis. *Giardia* concentration was associated with increased risks of ADC : RR=1.19 (95%CI=[0.96-1.48]) for 10 to 20 cysts/100 L, and RR=1.24 [1.06-1.45] for more than 20 cysts/100 L, compared to absence of detectable cysts. **Conclusion :** These results raise the question of protozoa or surrogates surveillance in drinking water, and confirm the need for better protection of exposed water sources, and for multibarrier treatments. **Keyword :** *Drinking water, infectious risks, Giardia, Cryptosporidium, epidemiological study*

---

Projet d'article à soumettre au JAWWA en mai 2001.

## **Introduction**

Infectious diseases continue to be an important public health problem throughout the world, and the provision of safe drinking water is a primary requisite to improve or maintain a satisfactory level of public health. In developed countries, disinfection and control of public water supplies has been one of the most successful public health interventions of the 20<sup>th</sup> century, dramatically reducing the incidence of waterborne diseases. But after the historical waterborne hazards such as cholera and typhoid had disappear, a variety of other waterborne pathogens have emerged in the past decades. As a result of technical progress, as PCR or immunofluorescence assay, highly infectious and resistant micro-organisms such as protozoa and viruses have been discriminated in drinking water (Lisle, 1995; Goldstein, 1996). These micro-organisms pose new challenges to the design and maintenance of safe water supplies. The most common health effect they induce is an acute form of gastrointestinal disease, which is typically mild and transient, but it may also result in more serious illness or even death in the most extreme cases. Waterborne infectious risks in developed countries persist on an epidemic mode, but also on an endemic mode as shown by recent epidemiological Canadian studies which have estimated that 14-40% of the reported gastrointestinal illness (in non epidemic conditions) were attributable to consumption of tap water that met current North American water quality criteria (Payment 1991, Payment , 1997a).

### ***Protozoa implications***

*Giardia intestinalis* trophozoites live in the small intestine of human and animal hosts. Cysts which average about 13 µm in length, are very resistant to adverse environmental conditions, and most infections probably result from ingestion of water or food contaminated with feces. It was estimated that *Giardia* has been responsible for about half of the outbreaks of disease in the US where the causal agent was identified (US-EPA, 2000). Giardiasis was recognized as the most common parasitic infection in the US : a nation-wide survey showed 1 to 19 stools positive for *Giardia*, while most other parasites were detected in less than 1% of the samples (CDC, 1991). The most common observed symptoms are diarrhea, followed by flatulence, full-smelling stools and cramps (Rose, 1999), but the symptoms can range from none to severe, chronic, diarrhea. Many cases of "traveler's diarrhea" are caused by *Giardia*, even in developed countries where potable water can be contaminated (Ohio-state web site). Members of the genus *Cryptosporidium* are intracellular parasite of the intestinal tracts of

various species, measuring about 3-5  $\mu\text{m}$ . It seems that members of this genus do not display a high degree of host specificity, so the number of species in this genus remains a matter of discussion. By 1972, *Cryptosporidium parvum* oocysts were detected in humans associated with diarrhea, and in the last decade, hundred of humans infections have been reported associated to *Cryptosporidium*, including epidemics in several major urban areas in the United-States. Transmission occurs through the fecal-oral route and has been shown to involve drinking water, recreational water, foodborne, person-to-person, and animal-to-person exposures (Perz, 1998). Many human infections have been traced to the contamination of drinking water with oocysts from agricultural "run-off". Indeed, cattle and agricultural inputs are suspected as the important sources of oocysts contaminating the water (Rose, 1997; Brasseur, 1998; Graczyk, 2000). Rainfall appears also to be an important risk factor in some outbreak (Carrollton in 1987, and Milwaukee in 1993). As for *Giardia*, not all infections induce symptoms (Perz, 1998); in most patients, infection causes a short term, mild diarrhea; but among immunocompromised subjects, this parasite can cause a pronounced, chronic and life-threatening diarrhea (Ohio-State web site, Canada, 1999). *C. parvum* has been reported to be the cause of over 14 outbreaks since 1985, including one in Milwaukee (Wisconsin) in 1993 that involved an estimated 400,000 illnesses and over 50 death among persons with HIV-infection (Mac Kenzie, 1994), and one in Las Vegas in 1994 with a fatality rate of 52.6% among the immunocompromised (Rose, 1997).

### ***Increasing awareness of the parasitical hazard***

The 1996 SDWA (Safe Drinking Water Act) Amendments identify several contaminants as high priorities for research and regulatory determinations, and include *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* among the most threatening microbiological contaminants found in drinking water (US-EPA, 2000). To date, if waterborne transmission of these protozoa is well established as a source of outbreaks, the role of tap water in endemic disease remains unclear (Perz, 1998). Concern persists that low levels of pathogen occurrence may be responsible for the transmission of background (endemic) level of enteric disease (Payment, 1997a). A risk assessment approach set up to examine the potential role of tap water in the transmission of endemic *C. parvum* infection concluded that low level transmission via tap water can represent an important exposure route for endemic *Cryptosporidium* infection (Perz, 1998). It is clear that protozoa are a prime candidates for worrisome levels of endemic transmission because they are ubiquitous in surface water and extremely resistant to various environmental pressures, including chemical disinfection

(Perz, 1998). Persistence in the environment is favored by organic substances (such as feces or suspended matter) and parasitological adsorption makes them less sensitive to inactivation agents. All these characteristics might contribute to the spread of infection. Currently, protozoa have become one of the most important waterborne pathogens in virtually all countries that predominantly rely on piped supplies.

It is still very difficult to assess accurately the impact of waterborne pathogens on public health. Given the technical difficulties of protozoa detection in environmental samples, that do not allow, to date, an efficient surveillance of parasitological water quality, monitoring of water quality is usually restricted to traditional index organisms for fecal pollution. In addition, outbreaks are only detected if they are relatively large and/or by coincidence, depending on the existence of surveillance systems. Now, bacterial indicators of faecal contamination are recognized as poor parasitological predictors (WHO, 1993), and the weakness of surveillance systems is one of the limits for assessing waterborne pathogens health impact, especially in Europe. The WHO European Center for Environment and Health has concluded in 1995 that "outbreaks of disease due to contamination from sewage systems or breakdowns in disinfection occur occasionally across Europe. The possibility of low levels of chronic disease and consequent morbidity is difficult to assess" ( ). Hence, infectious risks associated with parasitological transmission through drinking water are not well evaluated, and the true parasitological transmission by water may be underestimated. This work, which is a part of the E.M.I.R.A (Epidemiology and M.I.C.R.O.B.I.A.L Risk Assessment) study, aims at assessing risks, in a non epidemic context, due to these two protozoa of health interest conveyed through tap water.

## **Material and Methods**

The E.M.I.R.A study was carried out between October 1998 and June 1999, in the French Alps (Isère and Savoie departments, located in south-east France). One year before, a pilot study was performed to test the protocol feasibility. The E.M.I.R.A study combined a daily epidemiological follow-up of digestive morbidity among a panel of volunteers, and a microbiological surveillance of drinking water.

### ***Panel follow-up***

Volunteers have been recruited through the media, schools, town councils and water systems files among communities supplied by 4 public water systems, especially chosen for their raw water vulnerability : one "pristine" groundwater located in a quarstic environment (1); two vulnerable ground watersheds : a quarstic watershed (2), and an unprotected watershed exposed to livestock and community sewage (3); and one surface water : a lake surrounded by farm and human activities (4). Based on the results of the water quality control by the local health authorities, during the previous years, tap water of the 1<sup>st</sup> group always complied with the bacterial standards, and tap water of the 3 other groups complied for more than 80% of samples. Except in the first group which was untreated, water was disinfected by chlorine only. Each participating family had to complete a self-administrated daily questionnaire whereby all health problems were to be registered. Each week day, one fifth of the panel families was interviewed by telephone in order to retrieve these data, thus collecting information on the cases that occurred the same day and every day since the previous week call. This surveillance scheme allowed a continuous description of digestive morbidity incidence, and outbreaks detection. An "alert" threshold was based on the pilot study data, defined as the occurrence of 2 cases of acute digestive conditions in the same community (but not in the same household) during the same 48 h. A case of acute digestive conditions (ADC) was defined as an episode of abdominal pain, nausea, vomiting and/or diarrhoea; a case of diarrhoeic episode (DE) was an episode of diarrhoea with at least another digestive condition or fever; and a case of gastro-enteritis (GE) was an episode of diarrhoea with at least another objective sign ( fever or vomiting).

### ***Microbiological surveillance***

***Water samples collection*** : In parallel with the epidemiological surveillance, several tap water samples (for bacterial, virological and parasitical analyses) were collected in routine each month, and analyzed to assess the microbial quality of water in non outbreak conditions. In addition, when the alert threshold was exceeded in a community, water samples were also collected for analyses. These tap water samples represent the water quality very close to the suspected outbreak. During an outbreak alert, bacterial water quality was assessed on a 500 mL sample collected by a local sentinel the same day as the suspected outbreak. For assessment of parasitical quality, 100 L were collected at the sentinel home by a technician, the morning following the alert. Virological water quality was assessed with

samples (4.5 L) collected daily and stored for 3 to 5 days by each local sentinel (Gofti-Laroche, in press).

**Microbial analyses** : Samples were analyzed, 24 h after collection, on average. Bacterial analyses were performed by the regional water laboratory to check compliance with microbial quality standards : counts of total coliforms (/100 mL), absence of thermotolerant - "faecal"- coliform (/100 mL), of faecal streptococci (/100 mL), and of spores of sulfite-reducing clostridia (/20 mL). Protozoa, *Giardia* and *Cryptosporidium*, were analyzed after filtration of a large quantity of water (100 L) through a Gelman® Envirochek capsule. It was previously shown that the Gelman® capsule is a good membrane device for simultaneous concentration of *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. (Matheson, 1998). The analytical process used in this study is a modified protocol from the method initially recommended by the US-EPA (described by Le Chevallier in 1991) which presents many drawbacks (as poor and variable recoveries), and it uses a polyethersulfone cartridge (Envirochek has a 1 µm absolute pore size) in place of rolled polypropylene cartridge. This process appeared more appropriate to monitor the contamination levels of natural water. Recovery was improved by 12 to 37% with a coefficient variation of 36.4% (instead of 0.02 to 0.4% and 76% respectively) (Cervantes, 1997). After Gelman® cartridge elution and clarification using flotation through a specific gravity Percoll-sucrose density, (oo)cysts were detected by Immunofluorescence assay and enumerated by microscopy. These assays do not allow to record neither viability nor infectivity. During the study, the Vivendi-Waters laboratory improved the analytical process by using ImmunoMagnetic Separation (IMS) instead of Percoll-sucrose gradient in the clarification step, and by using a laser-scanning cytometry (Chemscan) for (oo)cysts enumeration step. Two sets of E.M.I.R.A samples (April and June 1999) were re-analyzed with this modified process. Also, virological analyses were performed using tangential ultra-filtration for concentration, and RT-PCR for viruses detection (Gofti-Laroche, in press).

### **Statistical analysis**

The relationship between incidence of ADC and concentrations of protozoa was modeled using Generalized Estimating Equations (GEE). After bivariate analysis conducted to identify predictors of risks, a logistic regression (GLM) was run to control for potential confounders and effect modifiers; p values for model building were set at 25%, not to overlook confounding and interaction. The Generalized Estimating Equations (GEE) model was eventually used to accommodate the longitudinal nature of the data (Liang, 1986; Zeger,

1985; Zeger, 1986); model selection was based on several statistical criteria (Akaike's Information Criteria, Deviance, or the Likelihood Ratio Test). Statistical analysis was performed using Excel®, Epi-info, SPSS®, Oswald 3.4 and S-plus 4.0.2 software-s.

## **Results**

### ***Study population***

The epidemiological follow-up of digestive morbidity involved 544 volunteers (176 households), with 27.5% of 0-14 years old subjects, distributed across the 4 water groups : 122 persons in the untreated water group (n°1), 100 persons in the quarstic water group (n°2), 100 persons in the unprotected watershed group (n°3), and 224 persons in the surface water group (n°4). As expected, in this kind of study based on a volunteer call, our panel was not representative of the general local population as to socioeconomic status (white collars, intermediate group, and employees are over-represented, with less farmers and blue collars), and as to age (our panel comprises a greater fraction of children, a feature that was wanted).

### ***Digestive morbidity***

712 cases of acute digestive conditions, 105 diarrhoeic episodes and 46 gastro-enteritis were observed. The average incidence rate was 2.8 cases per person-year for ADC, 0.4 for DE, and 0.2 for GE (table 1). Only 4 outbreak alerts were declared according to our definition, 1 alert in each group; but 3 were not confirmed as true outbreaks because the increase of ADC incidence observed in the two fifth of the panel was not confirmed in the remaining part of the volunteers.

### ***Tap water sampling***

8 routine sampling runs were performed between November 1998 and June 1999, providing 32 tap water samples for analysis, and 4 additional tap water samples were collected and analyzed during the 4 "epidemic alerts".

### ***Bacterial results***

The 3 communities with chlorinated tap water complied with the study inclusion criteria : while their resources were always contaminated with fecal indicators, tap water was not for more than 80% of the samples. Surprisingly, the untreated tap water group, chosen initially as a control, showed fecal indicators in two monthly water samples (compliance  $\leq$  80%

while 100% was expected). Three non compliance out of 6 were associated with the presence of 1 thermotolerant coliform, one with 2 spores of sulfite-reducing clostridia, one with 1 fecal streptococci, and the last with 90 thermotolerant coliform and 102 faecal streptococci (in April, run 6 of the 3<sup>d</sup> group). During the single confirmed outbreak in February 1999 in the third group, tap water complied with bacterial criteria, whereas viruses and protozoa were found.

### ***Parasitical results :***

Throughout the study, 30.6% (11 out of 36) of the samples were positive for at least one protozoa : 8 for *Giardia*, and 3 for *Cryptosporidium*. *Giardia* was found in tap water more often, and with higher levels than *Cryptosporidium* (tables 2 and 3). By contrast, during the pilot study (which was conducted with the same protocol in groups 1 and 2 between November 1997 and April 1998), *Giardia* was found only in one sample out of 12 (0.9 cysts/100 L), and *Cryptosporidium* in 4 samples out of 12 (at the level of 2, 3.4, 8.2, and 10 oocysts /100 L). All tap water positive samples of the pilot study complied with bacterial criteria. During the final study, 10 positive samples out of 11 also complied with bacterial criteria. The additional parasitical results provided by the re-analysis of some samples by IMS and Chemsan® are detailed in table 3.

### ***Association between digestive morbidity and waterborne parasitical exposure***

Occurrence of ADC was modeled according to microbial tap water quality and several covariates. The health indicator that was chosen for statistical analysis is incidence of ADC; while less specific, it is more sensitive than the 2 others (DE and GE). Data were analyzed to take into account the within-subject time- correlation and several covariates (confounding or effect modifiers). To improve exposure ascription, ADC was computed for time units restricted to more or less 3 days around the corresponding water sample. Beforehand, modelization was also tested with health data limited to more or less 7 days and 15 days, but these long time units showed no association, suggesting exposure misclassification. The fitted GEE model included community, age, tap water intake, compliance with bacterial criteria (dummy variable), presence or absence of 2 viral markers (enterovirus and astrovirus)(dummy variables), and *Giardia* counts. House characteristics, gender, prevalence of rotavirus or of *Cryptosporidium* (*Cyptosporidium* data were clearly too scarce for analysis) showed no association with ADC incidence. Relative risks for *Giardia* are :

RR=1.19 (95%CI=[0.96-1.48]) for 10 to 20 cysts/100 L, and RR=1.24 [1.06-1.45] for more than 20 cysts/100 L compared to absence of detectable cysts.

## **Discussion**

### ***Main results***

The main results of this study can be summarized as follow : (1) digestive morbidity occurs on an endemic level, with average incidence rates of ADC, DE and GE respectively being 2.8, 0.4 and 0.2 cases per person-year. (2) The analytical process was able to find (oo)cysts from tap water samples, and detection may be improved by IMS-Chemscan tools, especially for *Cryptosporidium*. (3) We observed a high prevalence of protozoa in tap water (>30%) : 11 tap water samples out 36 were positive for *Giardia* or *Cryptosporidium*, despite absence of bacterial indicators (10 samples out of 11). (4) Finally, a trend was found between counts of *Giardia* cysts in drinking water and incidence of ADC.

### ***Health data***

The longitudinal design of the study with active phone surveillance, provided a quasi-exhaustive collection of data. Prospective studies that allowed quantification of rates of acute gastro-intestinal conditions provide similar figures, about 0,5-2,0 cases per person-year, according to age and to case definition (Payment, 1991; Zmirou, 1995; Payment, 1997a; Hellard, 2000). The endemic rather than epidemic pattern of ADCs in water systems that comply, essentially, with bacterial standards confirms previous studies carried out in the same region of France (Zmirou, 1987 and 1995). Despite absence of outbreaks, it was possible to find an association between digestive morbidity and *Giardia* cysts in water.

### ***Parasitological detection***

Given the expected low parasitological density in tap water, sampling volume has to be sufficient, and extraction and concentration steps have to precede direct protozoa detection. We used 100 L samples, and an analytical process which had showed in a previous validation study high and reproducible recovery rates for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts (70-80%) in raw water and finished drinking water samples (Cervantes, 1997; Matheson, 1998). Recoveries were significantly higher than with other methods and the Envirochek capsule also allowed time savings. The easy use of Envirochek capsules for enhanced analysis of water samples indicates that this method is a good candidate for routine

laboratory practice of water quality control and may be a useful tool for public health protection. However, for these techniques to be used for parasitological water surveillance, the corresponding know-how should be transferred to the field professionals, and that the analytical costs should be reduced. Envirochek capsule was recently approved by the US-EPA for sample concentration (Matheson, 1998; US-EPA, 1999). As suggested in the recent literature (Compagnon, 1999; Zanelli, 2000), the analytical process including purification by IMS and detection by the Chemsan improved detection of protozoa in water, especially *Cryptosporidium*.

### ***Giardia and Cryptosporidium prevalence in water, and association with bacterial standards***

Now, in our study, *Giardia* was detected more often and with higher levels in tap water than *Cryptosporidium*. Previous studies concluded that potentially human-infective *Giardia* cysts are commonly found in raw surface water and sewage in Canada, although cysts viability is frequently low; they also stated that *Cryptosporidium* oocysts are less commonly found (Wallis, 1996; Isaac-Renton, 1999). For example, *Giardia* cysts were found in 21% of raw water samples and in 18.2% of treated water samples, and *Cryptosporidium* oocysts respectively in 4.5% and 3.5%, also suggesting that conventional treatment is more efficient against *Giardia* than against *Cryptosporidium* (Wallis, 1996). Recent studies, however, focus on *Cryptosporidium* that is seen as a greater public health hazard : 3.8 to 40% treated drinking water samples are positive for *Cryptosporidium* with a range of concentration between 0.001 to 0.72 oocysts/L (Rose, 1997). There may be a trend for higher concentrations and more frequent prevalence of *Giardia* cysts in water samples during spring and fall (Wallis, 1996), and of *Cryptosporidium* during fall and winter (Payment, 2000). The E.M.I.R.A study period was then a favorable period for (oo)cysts investigations in water.

In our study communities, increased water sampling showed that tap water did not comply with bacterial standards as perfectly as was expected. One should keep in mind that water samples analyzed during this study came from 4 public water systems chosen for their raw water vulnerability. These water systems are representative neither of water supplies nor of the average drinking water quality in France. Selection of disinfection-only treatment despite vulnerable water resources allowed to show that current microbial water quality standards are not associated with presence of virus or protozoa of health significance. Presence of

protozoa in water complying with bacterial standards has been reported previously (Kramer, 1996). It is now widely recognized that bacterial standards for water used as safety criteria are mediocre parasitological contamination indicators for tap water, although they keep all their relevance for general protection of public health. Our results confirm this and raise the question of protozoa surveillance in tap water, or research of additional parasitological quality surrogates in drinking water.

### ***Limitations of the study***

The time coupling between health and microbiological surveillance offered the opportunity to investigate the association between parasitological markers and digestive morbidity. While health data collected daily among volunteers are as accurate as possible, assessment of waterborne virus and protozoa exposure is limited by lack of representativeness of monthly or periodic samples, and by the several limitations of the available analytical techniques. It should be first recognized that assessment of exposure to *Giardia* cysts is obscured by lack of knowledge as to their viability and infectivity (Cervantes, 1997; Brasseur, 1998). In order to reduce exposure misclassification statistical analysis was restricted to a subset of ADC data, close to (+/-3 days) water samples; 63.6 % of person-days of observation were thus discarded for the sake of validity, after different time scales had been tested. However, in a study conducted in the Province of Quebec, Payment *et al* concluded that there were only small differences in counts of *Giardia* cysts between samples collected sequentially along different days or at different hours of the same day (Payment, 1997b).

Because some viruses were also measured during this study, and their presence accounted for in this analysis, we think these results are not confounded by these pathogens. Of course, this does not hold true for any pathogens, including small round structured viruses (SRSV) that were not measured in this study. While astroviruses exhibited an independent effect, our results did not show any association for rotavirus. A slight effect of rotavirus occurrence is suggested however when focused on children (less than 4 years) : presence of rotavirus is mildly associated with an increased risk. We hypothesize that the effect of rotavirus may be masked by a lack of power and by the fact that, in this study, prevalence of this virus and of protozoa were unrelated. Absence of a significant effect of *Cryptosporidium* was expected, given the very few positive samples. These results are robust : the association remains positive for any GLM or GEE models that were tested and the intensity of the association remains unchanged whatever for different combinations of potential confounding factors

was included; in addition, they are consistent with the literature (Rose, 1999). However, while the role of *Giardia* in waterborne outbreaks is largely documented, its role in the background noise of digestive morbidity in the general population is not so (Isaac-Renton, 1999).

Secondary transmission was not assessed in our study, although it might contribute to the endemic spread of disease (Perz, 1998). Issues related to susceptibility or to acquired immunity were not really investigated in this work either. Volunteers of E.M.I.R.A study were recruited among the general population, some of them were young children, elderly, and pregnant women, but individuals with chronic diseases were excluded for ethical reasons. The sensitive segments of the population has been evaluated to about 20% of the population of the United-States. It includes the very young, the elderly, pregnant women, and the immunocompromised, who could experience serious illness and mortality after ingestion of water and foodborne enteric microorganisms, and this population is expected to increase significantly along the new century (US-EPA, 2000; Gerba, 1996). To date, prospective studies on water quality have restricted the susceptible subjects to children, who exhibit greater disease rates (Payment, 1991; Zmirou, 1995; Payment, 1997a; Hellard, 2000). While of great interest, studies involving immunocompromised persons (HIV patients, or subjects with home dialysis ...) pose serious ethical challenges, in addition to problems associated with sample size considerations. In a survey conducted at the new York Hospital-Cornell Medical Center, it was shown that despite a greater concern for waterborne infection, 82% of HIV-infected subjects reported consuming municipal tap water (Davis, 1998). Based on such considerations, the SDWA requires the US-EPA to establish national drinking water standards intended to protect the general population as well as sensitive subpopulations.

To date, little data are available on human immunity against protozoa and show intriguing associations between serological response to *Giardia* and *Cryptosporidium* among communities with different drinking water supplies and prevalence of (oo)cysts in water (Isaac-Renton, 1999). Serological response to *Cryptosporidium* was recently investigated in southern Europe. It was found that serological response was higher among Italian blood donors than among United-States blood donors, leading to the hypothesis that this could explain why occurrence of detectable cryptosporidiosis seems lower in Europe than in the U-S (Frost, 2000). Another recent study indicates that prior exposure to *Cryptosporidium* may

provide protection against infection and illness at low oocysts doses (Chappell, 1999); in the same study framework, however, it was also concluded that initial exposure to *Cryptosporidium* was not sufficient to protect against re-exposure and/or clinical illness (Okhuysen, 1998), showing that this question is not settled yet. Most authors suggest that, if this immunity exists, it is very short and limited (Edberg, 1996).

## **Conclusion**

Recent analytical developments for protozoa detection lead to increased understanding of their role in the occurrence of waterborne gastro-enteritis. In France and other comparable countries, health and water surveillance should adapt in order to cope with this risk factor and with other sources of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora*, an emerging pathogen, especially food contamination. Research on predictors in drinking water and other media represents an important challenge for microbial risk assessment and management. While various water treatments are under development, physical removal of (oo)cysts seems to date the best process (an absolute 1 µm pore-size membrane filter or smaller has been recommended by the CDC), in accord with the principle of multibarrier treatment.

## **Acknowledgements :**

To Central Laboratory of the Générale des Eaux (Vivendi Waters), the French Ministry of Environment (research program Health and Environment), and the French Water Agencies, provided financial support to this study. The authors thank Pr Ph. Hartemann, from the Department of Environment and Public Health of Nancy University, L. Belleville and A. Guilloud, from the Local Services of the Ministry of Health, Pr J-M Seigneurin, Dr B. Gratacap-Cavallier and O. Genoulaz, from the Molecular Medical Virology Laboratory of Grenoble University Hospital, Dr P. Chevallier and Mrs Bouvier, from the Regional Laboratory of Water Analysis, for their technical assistance. Authors are especially grateful to Eric Da Silva from the CAREPS of Grenoble University Hospital, who was in charge of the phone calls. Acknowledgements are extended to E.M.I.R.A communities mayors for their pleasant collaboration, and to E.M.I.R.A volunteers for their essential and faithful participation.

## References

1. Brasseur P, Uguen C, Moreno-Sabater A, Favennec L, and Ballet J.J. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters. *Folia parasitologica*, 1998, 45 : 113-116.
2. Canada. Relevé des maladies transmissibles au Canada. Ecllosion de Cryptosporidiose associée à l'eau d'une fontaine – Minnesota, 1997. Notes internationales, 1999. [http : //www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/publicat/ccdr/99vol25/rm2502fb.html](http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/publicat/ccdr/99vol25/rm2502fb.html).
3. Centers for Disease Control and Prevention. Results of testing for intestinal parasites by state diagnostic laboratories, Unites-States, 1987. (1991), *MMWR*, 40 : 25-45.
4. Cervantez P, Robert C, Mennecart V, Compagno B and Joret J.C. *J Europ Hydrologie*, 1997, 28 (2) : 155-172.
5. Chappel C.L, Okhuysen P.C, Sterling C.R, Jakubowski W, and Dupont HL. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 60 (1) : 157-164.
6. Compagnon B, De Savornin-Lohman A, Ficht L *et al.* Evaluation of flow cytometry and cell sorting for the recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* from surface and treated water samples. WQTC 99, AWWA, Tampa USA, 31 october- 4 november 1999, 21 p.
7. Davis L.J, Roberts H.L, Juranek D.D, Framm S.R and Soave R. A survey of risk factors for cryptosporidiosis in New York City : drinking water and other exposures. *Epidemiol. Infect.* 1998, 121 : 357-367.
8. Edberg S.C. Are there human indicators of an emerging public health threat ? Proceeding AWWA, Boston 17-20 Nov 1996.
9. EPA. Method 1623 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. April 1999. [www.epa.gov/safewater](http://www.epa.gov/safewater)
10. EPA. Report to congress. EPA studies on sensitive subpopulations and drinking water contaminants. December 2000. [www.epa.gov/safewater](http://www.epa.gov/safewater)
11. Frost F.J, Fea E, Gilli G *et al.* Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in southern Europe. *Eur J Epidemiol*, 2000, 16 : 385-390.
12. Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Sensitive populations : who is at the greatest risk ? *Int J Food Microbiol.* 1996, 30 : 113-123

13. Gofiti-Laroche L, Gratacap-Cavailler B, Genoulaz O *et al.* A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water [EMIRA Study]. *Water Sc Technol* (in press).
14. Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O *et al.* Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the art water treatment. *Ann Intern Med*, 1996, 124: 459-
15. Graczyk T.K, Evans B.M, Shiff C.J, Karreman H.J, and Patz J.A. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environ ResSection A*, 2000, 82 : 263-271.
16. Hellard ME, Sinclair MI, Forbes AB, Fairley CK. A randomized blinded controlled trial investigating the gastrointestinal health effects of drinking water quality. *Environ Health Perspect* (in press).
17. Isaac-Renton J, Blatherwick J, Bowie W.R *et al.* Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1999), 60 (4) : 578-583.
18. Kramer M.H, Herwaldt B.L, Craun G.F, Calderon R.L, and Juranek D.D. Surveillance for waterborne disease outbreaks, US, 1993-94. *MMWR*, 1996. CDC Surveillance Summary, 45 : 1-33.
19. Kramer M.H, Quade G, Hartemann P, and Exner M. Waterborne diseases in Europe 1986-1996. *JAWWA*, 2001, 48-53.
20. Le Chevallier M.W, Norton W.D, and Ramon G.L. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57 : 2610-2616.
21. Liang K.Y and Zeger S.L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* (1986), 73 : 13-22.
22. Lisle J.T and Rose J.B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and the UK : a mini review. *J Water SRT-aqua*, 1995, 44 : 103-117.
23. Mac Kenzie W.R, Hoxie N.J, Proctor M.E *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* (1994), 331 : 161-167.
24. Matheson Z, Hargy T.M, McCuin R.M, Clancy J.L, and Fricker C.R. An evaluation of the Gelman Envirochek capsule for the simultaneous concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* from water. *J Appl Microbiol*, 1998, 85 : 755-761.

25. Ohio-State web site. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/giardia.html>
26. Okhuysen PC, Chappell C.L, Sterling C.R, Jakubowski W, and Dupont H.L. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun*, 1998, 66 : 441-443.
27. Payment P, Richardson L, Siemiatycki J *et al*. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am J Public Health*. 1991, 81: 703-708
28. Payment P (a), Siemiatycki J, Richardson L *et al*. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effect due to the consumption of drinking water. *Int J Environ health Res*, 1997 ; 7: 5-31.
29. Payment P (b), Berte A, and Fleury C. Sources of variation in isolating rate of *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. *Can. J. Microbiol*. 1997, 43 : 687-689.
30. Payment P, Berte A, Prevost M, Menard B, and Barbeau B. Occurrence of pathogenic microorganisms in the St Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Can J Microbiol*, 2000, 46 : 565-576.
31. Perz JF, Ennever FK, Le Blancq SM. *Cryptosporidium* in tap water. Comparison of predicted risks with observed levels of disease. *Am J Epidemiol* 1998, 147:289-301.
32. Rose J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health*. 1997, 18 : 135-161.
33. Rose J.B and Slifko R. *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* and their impact on foods : a review. *J Food Protection* (1999), 62 (9) : 1059-1070.
34. Venczel L.V, Arrowood M, Hurd M, and Sobsey M.D. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol*. 1997, 63 (4) : 1598-1601.
35. Wallis P.M, Erlandsen S.L, Isaac-Renton J.L, Olson M.E, Robertson W.J, and Van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. Isolated from Drinking water in Canada. *Appl. Environ. Microbiol*. 1996, 62 (8) : 2789-2797.
36. World Health Organisation. Guidelines for drinking water quality. recommendations, Vol 1. 1993

37. Zanelli F, Compagnon B, Joret J.C, and De Roubin M-R. Enumeration of *Cryptosporidium* oocysts from surface water concentrates by laser-scanning cytometry. Minimizing the risk from *Cryptosporidium* and other waterborne particles. IAWQ, Paris, France, 19-23 april 1999, 10 p.
38. Zeger S.L and Liang K.Y. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*, 1986, 42 : 121-130.
39. Zeger S.L, Liang K.Y, and Self S.G. The analysis of binary longitudinal data with time independent covariates. *Biometrika*, 1985, 72 : 31-38.
40. Zmirou D, Ferley JP, Collin JF *et al.* A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriological substandard drinking water. *Am J Public Health*, 1987 ; 77 : 582-584.
41. Zmirou D, Rey S, Courtois X *et al.* Residual health risk after simple chlorine treatment of drinking water in small community systems. *Eur. J. Publ. Health*, 1995 ; 5 : 75-81.

Table 1 : Incidence (I) and Incidence Rate (IR in person-year) of acute digestive conditions, diarrhoeic episodes and gastro-enteritis, for the 4 study groups followed during 212 days (16/10/98 to 18/06/99).

|            | Sample size | ADC |            | DE  |            | GE |            |
|------------|-------------|-----|------------|-----|------------|----|------------|
|            |             | I   | IR [CI95%] | I   | IR [CI95%] | I  | IR [CI95%] |
| Group 1    | 122         | 167 | 3.1        | 26  | 0.5        | 14 | 0.3        |
| 19 391 p-d |             |     | [2.7-3.6]  |     | [0.3-0.7]  |    | [0.1-0.4]  |
| Group 2    | 100         | 83  | 2.0        | 14  | 0.3        | 9  | 0.2        |
| 15 004 p-d |             |     | [1.6-2.5]  |     | [0.2-0.5]  |    | [0.1-0.4]  |
| Group 3    | 100         | 191 | 4.7        | 30  | 0.7        | 9  | 0.2        |
| 14 961 p-d |             |     | [4.0-5.3]  |     | [0.5-1.0]  |    | [0.1-0.4]  |
| Group 4    | 224         | 271 | 2.3        | 35  | 0.3        | 14 | 0.1        |
| 42 830 p-d |             |     | [2.0-2.6]  |     | [0.2-0.4]  |    | [0.1-0.2]  |
| Total      | 544         | 712 | 2.8        | 105 | 0.4        | 46 | 0.2        |
| 92 186 p-d |             |     | [2.6-3.0]  |     | [0.3-0.5]  |    | [0.1-0.2]  |

Table 2 : Parasitological quality of tap water (cysts per 100 L)

|                  | Group 1        |               | Group 2        |               | Group 3        |               | Group 4        |               |
|------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                  | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> |
| Run 1            | <              | <             | <*             | <             | <              | <             | <              | <             |
| Run 2            | 30             | <             | 10             | <             | <              | <             | <              | <             |
| Run 3            | <              | <             | <              | <             | <              | <             | 110            | <             |
| Run 4            | 10             | <             | 20             | <             | 10             | <             | <              | <             |
| Run 5            | <*             | <             | <              | <             | <              | <             | <              | <             |
| Run 6            | <              | <             | <              | <             | <*             | 4             | <              | <             |
| Run 7            | 10             | <             | <              | <             | <              | <             | <              | <             |
| Run 8            | <*             | <             | <              | <             | <              | <             | <              | <             |
| -----            |                |               |                |               |                |               |                |               |
| Epidemic alert 1 | <              | <             |                |               |                |               |                |               |
| Epidemic alert 2 |                |               |                |               |                |               | <              | <*            |
| Epidemic alert 3 |                |               |                |               | 10             | <             |                |               |
| Epidemic alert 4 |                |               | <              | <             |                |               |                |               |

< : below the detection limit                      \* Non compliance with bacterial criteria

Table 3 : Additional parasitological results (cysts or oocysts per 100 L) after ImmunoMagnetic Separation and Chemsan<sup>®</sup> count on run 6 and run 8 samples, and comparison with results with flotation and visual lecture

|   | Group 1        |               | Group 2        |               | Group 3        |               | Group 4        |               |
|---|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|   | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> | <i>Giardia</i> | <i>Crypto</i> |
| <b>Run 6</b>  |                |               |                |               |                |               |                |               |
| 1 <sup>st</sup> Results (flotation and visual lecture)  | NA             | NA            | NA             | NA            | <              | 4             | <              | <             |
| 2 <sup>nd</sup> Results (IMS and Chemsan <sup>®</sup> ) | NA             | NA            | NA             | NA            | <              | 2             | <              | 2             |
| <b>Final Results**</b>                                  | NA             | NA            | NA             | NA            | <*             | <b>3</b>      | <              | <b>1</b>      |
| <b>Run 8</b>  |                |               |                |               |                |               |                |               |
| 1 <sup>st</sup> Results (flotation and visual lecture)  | <              | <             | <              | <             | <              | <             | <              | <             |
| 2 <sup>nd</sup> Results (IMS and Chemsan <sup>®</sup> ) | <              | <             | <              | 8             | <              | <             | <              | <             |
| Final Results**   | <*             | <             | <              | <b>4</b>      | <              | <             | <              | <             |

\* Non compliance with bacterial criteria

NA : not available

\*\* Final results average 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> results counts which each correspond to 50% of the total sample

### **3.10-Article VI : Evaluation du risque microbiologique hydrique : construction épidémiologique d'une fonction dose-réponse pour *Giardia* (étude E.M.I.R.A)**

#### **WATERBORNE MICROBIAL RISK ASSESSMENT : EPIDEMIOLOGICAL CONSTRUCTION OF DOSE-RESPONSE FUNCTION FOR *GIARDIA SPP.* (E.M.I.R.A STUDY)**

L. Gofti-Laroche<sup>1</sup> and D. Zmirou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Public Health Laboratory of Grenoble Medical School

Contact for information : Leïla Gofti-Laroche, Laboratoire de Santé Publique, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38 706 La Tronche Cedex, France. Tel : + 33 4 76 63 88 15; Fax : + 33 4 76 51 01 58; e-mail : [leila.gofti@ujf-grenoble.fr](mailto:leila.gofti@ujf-grenoble.fr)

**Abstract :** Dose-response parameters based on clinical challenges are used to assess the health impact of protozoa in drinking water. This work aims at constructing a dose-response function for *Giardia* through an epidemiological study in a general population exposed in a natural setting. It combined a daily follow-up of digestive morbidity among a panel of 544 volunteers and a microbiological surveillance of tap water that encompassed parasitological assays. The relationship between incidence of acute digestive conditions (ADC) and concentrations of *Giardia* cysts was modeled with Generalized Estimating Equations adjusting on community, age, tap water intake, presence of bacterial indicators, and viruses genetic markers. Estimated risks attributable to *Giardia* were compared, using a Monte Carlo simulation, to risks computed according to the currently used dose-response function. The estimated dose of *Giardia* combined drinking water intake and Ln transform of cysts concentrations; the unit increment of dose was associated with an increased risk of ADC : OR=1.58 (95% CI: 1.51, 2.13), for a consumption of 2 L/d. Comparison of attributable risks derived from our model and from the published dose-response function showed a very good consistency assuming a 20 % abatement of cysts counts. While risk assessments of waterborne *Giardia* acute digestive diseases based on experimental dose-response parameters seem accurate, much remains to be learned as to germ viability, infectivity and virulence in natural settings.

**Key world :** Risk assessment, dose-response function, waterborne *Giardia*, epidemiology

Infectious and resistant organisms such as protozoa and viruses have elicited several outbreaks around the world, including in developed countries. The most noticeable pathogen is *Cryptosporidium* which caused the outbreak of Milwaukee in the US [1], and several outbreaks in the UK [2]; but *Giardia* is also frequently reported in association with waterborne diseases [3; 4; 5]. *Giardia lamblia* is the most common intestinal protozoan in the US. Cysts (which average 9-13  $\mu\text{m}$ ) may be found in water as a result of fecal contamination from both man and animal. The incubation period is between 3 and 60 days, and 20-70 percent of infected subjects develop symptoms [6]. Contrary to *C. parvum*, efficient medical treatment exists for *G. lamblia* (metronidazole, paromomycin ...). Low level of these pathogens in water might be also responsible for transmission of endemic levels of enteric diseases [7; 8]. Thus, protozoa pose major challenges to design and maintenance of safe water supplies. Microbial risk assessment is an important tool to manage these new risks because it allows water quality standards and other management decisions to be based on quantitative estimates of public health risks [5; 9; 10]. For instance, the US-EPA has recommended that a treatment be provided to ensure that populations are not subject to a yearly risk of infection of greater than  $10^{-4}$  [3; 11].

### ***The microbial risk assessment approach***

The quantitative microbiological risk assessment approach follows the general framework proposed for chemical risk assessment, with the four basic steps (hazard assessment, exposure assessment, dose-response assessment and risk characterization) [10; 12; 13]. However, there are specific features of micro-organisms and their interaction with hosts and their environment [5]. Microbial exposure may result in infection (without apparent illness), morbidity, or mortality. Exposure assessment aims to assess the amount of pathogens that are ingested per exposure event. It involves evaluation of the level of micro-organism in drinking water, and of water intake. As a default value, two liters per person-day (L/p-d) is used to estimate drinking water intake. Human dose-response studies are available for many micro-organisms to assess the effects at low level exposure [13]; most are based on animal experiments or – for protozoa – on clinical studies with healthy adults. The risk characterization step combines the information on the previous steps to produce an estimation of the likelihood of an adverse effect. The result of many risk assessment procedures, is a single risk estimate that combines point parameters for exposure and for the dose-response function, yielding a central tendency value, or alternatively an extreme value,

often used to represent a so called ‘worst case scenario’ risk estimate. An alternative approach, which is receiving increasing favour, is to characterize the full distribution of exposure and dose-response relationship using Monte Carlo simulation techniques that yield a probability distribution of risk [13]. Risk assessment will be used by risk managers to implement actions and policies designed to reduce the estimated risks to the population; it also provides the basis for risk communication [10].

### ***Dose-response functions***

Recent development in dose-response assessment for waterborne pathogenic micro-organisms allows to assess quantitatively the health impact of exposure to waterborne pathogens [14-18]. Several probability distributions used in this field and also in the field of microbial food safety can be reviewed in Vose’s paper (1998) [19]. There are basically two major routes for establishing dose-response functions directly applicable to humans :

(1) the experimental approach implies trials on volunteers. Adult, healthy subjects, have been exposed to known amounts of well characterized micro-organisms and followed, to ascertain the development of signs of infection/or disease (eg faecal excretion, seroconversion). Best fitted parameters of a dose-response relationship may be computed via standard maximum likelihood techniques, and confidence limits to the parameters can be used for low dose extrapolation [13]. The exponential and the beta-Poisson model are commonly used [5; 14; 20]. They are based on the assumptions of independent, single hit action, and random distribution of the micro-organisms in the inoculum. Rendtorff (1954) [21] and Dupont *et al* (1995) [22] performed controlled human feeding trials respectively for *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* (oo)cysts. For *Cryptosporidium* and for *Giardia*, the exponential model was fit the data [20; 22]. The use of a non threshold model makes biologic sense because micro-organisms are capable of replicating within their host [18]. But it must be kept in mind that infection was measured by cyst excretion, illness was not determined, and that an important issue is uncertainty about infectivity due to strain variation and to the immune response. These limitations must be taken into account when using the model as a predictive tool [3]. The method has been illustrated for human rotavirus [16; 17; 23] and *Giardia* [3]. This approach, however, is faced with severe ethical restrictions that limit trials to healthy adult volunteers, and non-lethal health endpoint. There are also questions regarding strain selection that make generalization of such data difficult [5].

(2) Epidemiological data offer the advantage to be based on natural infection events, to bear on a varied host populations and on micro-organisms that are found in real life situations [5]. To our knowledge, published epidemiological studies that were used to assess dose-response functions took place in the context of outbreaks, where serious difficulties are encountered for retrospective exposure assessment. For instance, a risk assessment was conducted on the basis of disease risk parameter estimated after the dose-response model developed by Dupont on healthy human volunteers (1995) [22], and compared to the observed attack rates during the Milwaukee *Cryptosporidium* outbreak [1] to derive concentration estimates of the pathogen in drinking water; the results proved consistent with the levels that were found in ice samples (1.4 oocysts/L versus 0.79 oocysts/L) [13; 24]. Similar conclusions were drawn in another outbreak in Bradford (UK) [13].

Because microbial risk assessment is crucial to optimise risk management, using accurate dose-response data is an important issue. This work aims at constructing dose-response parameters for *Giardia* in a natural setting, through an epidemiological study of general population exposed to environmental strain of micro-organisms. Risks estimates derived from this epidemiological study will also be compared, through a Monte Carlo simulation, to values based on published dose-response parameters.

## **Materials and methods**

The E.MI.R.A (Epidemiology and Microbial Risk Assessment) study was carried out between October 1998 and June 1999, in south-east France. It combined a daily epidemiological follow-up of digestive morbidity among a panel of volunteers, and a microbiological surveillance of drinking water. The E.MI.R.A study design is described in detail elsewhere [25; 26; and Gofti-Laroche, unpublished manuscript].

### ***Health survey***

Briefly, volunteers have been recruited among communities supplied by 4 public water systems (groups one to four), specifically chosen for their raw water vulnerability. Except in the first group which was untreated, water was disinfected by chlorine only. Each participating family had to complete a self-administrated daily questionnaire whereby all health problems were to be registered. Morbidity data were retrieved by telephone calls,

following a daily 1/5<sup>th</sup> sampling procedure. This surveillance scheme allowed a continuous description of digestive morbidity incidence, along with outbreaks detection. An "alert" threshold was based on a pilot study data, and was defined as the occurrence of two incident cases of acute digestive conditions in the same community (but not in the same household) during the same 48 hours. To be considered as distinct, a lag greater than 48 hours was required between 2 episodes. A case of acute digestive conditions (ADC) was defined as an episode of abdominal pain, nausea, vomiting and/or diarrhoea; a case of diarrhoeic episode (DE) was an episode of diarrhoea with at least another digestive condition or fever; and a case of gastro-enteritis (GE) was an episode of diarrhoea with at least another objective sign (fever or vomiting).

E.M.I.R.A volunteers were also asked about their drinking water consumption. Data were collected a week day and a week-end day by self-questionnaires. Questions focussed on tap and bottled water intake, but also on the specific usage of tap water (cold/hot, with or without additional product), and the place of consumption.

### ***Water quality survey***

Tap water samples were collected monthly in each group to assess the parasitological quality of water in non outbreak conditions. Additional tap water samples were also collected, in case the alert threshold was exceeded. *Giardia* and *Cryptosporidium* were analyzed after filtration of 100 L of water through a Gelman® Envirochek cartridge. The analytical process used in this study is a modified protocol from the method recommended by the US-EPA (described by Le Chevallier in 1991) [27], which appeared appropriate to monitor simultaneously the contamination levels of *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp in natural water [28]. It includes several steps : concentration, elution, purification, identification and enumeration. The detection limit was 10 cysts/100 L and the recovery rate averaged 50 percent. During the study, the analytical process was improved using ImmunoMagnetic Separation (IMS) instead of Percoll-Sucrose gradient in the clarification step, and a laser-scanning cytometry (Chemscan) for the (oo)cysts enumeration step.

### ***Statistical analysis***

Due to the longitudinal design of the study, with repetitive measurements on the same subjects, the relationship between incidence of digestive morbidity and concentrations of protozoa was modelled using Generalized Estimating Equations (GEE) with a logistic link

function. To enhance sensitivity in confounders' selection and effect modification assessment, the decision p value were set at 0.15. Exposure was modelled as a quantitative variable that expresses the "dose" of ingested pathogens, by combining individual tap water intake and *Giardia* counts (after Ln transformation). Model selection was based on several criteria (Akaike's Information Criteria, Deviance and the Likelihood Ratio Test). To improve exposure ascription, the relationship was tested for different time lags : more or less than 15 days around the corresponding water samples, more or less seven days, and three days; results of the latter exhibited greater associations and are presented hereafter. Incidence of ADC rather than DE or GE was chosen as the health endpoint because, while less specific, it is a more sensitive measure of acute digestive morbidity.

The dose-response function that was derived from our epidemiological data was compared to estimates of infectious risks computed after the dose-response curve established by Rendtorff (1954) on healthy human volunteers [21]. It is an exponential dose-response curve:  $P_i = 1 - \exp(-rD)$ , where  $P_i$  is the individual daily probability of infection,  $r$  is an organism-specific infectivity parameter (host-microorganism interaction), and  $D$  is the daily ingested dose of parasites. For *Giardia*,  $r = 0.02$  (95 percent confidence interval : 0.0098, 0.036) [6]. The dose is computed as follows :  $D = CV$ , where  $C$  is the concentration by liter of cysts in tap water, and  $V$  is the individual's consumption of unboiled water per day [29]. This model assumes that : (1) pathogens are randomly distributed at the exposure site; (2) a fraction of the micro-organisms ingested survive to cause infection; (3) the survival of an individual organism is independent of the presence of any other organism [6; 30]. Illness is conditional on infection, and the probability of becoming ill can be written as :  $P(\text{ill}/\text{dose}) = P(\text{ill}/\text{inf}) * P(\text{inf}/\text{dose})$  [30], i.e., probability of morbidity is a part ( percent) of the probability of infection supplied by the model. Since the risk derived from the Rendtorff model is directly attributable to germ ingestion, corresponding figures were computed from our model as : relative excess risk =  $(I_o \times OR_i - I_o)/I_o$ , that is  $(OR_i - 1)$ , where  $OR_i$  is the odds ratio associated with "dose"  $i$  (ie water intake x Ln[concentration  $i$ ]), and  $I_o$  is the baseline incidence rate (i.e., when concentration is zero). Thus, risks attributable to increasing counts of *Giardia* can be directly compared across the two estimation procedures. Actually, both risk estimates are not exactly identical by nature, an issue that will be commented in the discussion section. The comparative analysis was undertaken using Monte Carlo simulation techniques performing 5000 iterations and Latin Hypercube Sampling to help stabilize rapidly the tails of the outputs, as recommended by .Burmester (1994) [31].

Statistical analysis was performed using Excel®7.0, Epi-info 6, SPSS®7.5, Oswald 3.4, S-plus 4.0, and @Risk 3.5 (Palisade corporation) software-s.

## Results

The epidemiological follow-up involved 544 volunteers distributed across the 4 water groups, with 27.5 percent of children (0-14 years old) and 12.1 percent subjects over 60 years old. Only four “epidemic alerts” were declared according to our definition, but only one true outbreak was confirmed (group three in February 1999). The ADC incidence rate was 2.8 cases per person-year (95 percent confidence interval : 2.6, 3.0). The incidence of gastro-enteritis 0.2 cases per year. Detailed results on the study population and the observed digestive morbidity are presented elsewhere [25; 26].

Tap water intake follows a normal distribution and varies according to season (mean in winter = 1.6 L/j, SD = 0.7 L/d; mean in spring = 1.8 L/j, SD = 0.8 L/d). For Monte Carlo simulation, we used our data set on individual unboiled tap water intake, which is log-normally distributed (geometric mean = 0.8 L/d, geometric SD = 0.3 L/d). Detailed description of daily drinking water consumption of E.M.I.R.A volunteers is available in Gofti-Laroche *et al* [26].

Thirty two tap water samples were analyzed, provided by the eight routine sampling runs between November 1998 and June 1999. Four additional tap water samples were analyzed because of four "epidemic alerts". Throughout the study, 30.6 percent (11 out of 36) of the samples were positive for at least one protozoa : eight for *Giardia*, and three for *Cryptosporidium*. The maximum concentration recorded was 110 cysts/100 L for *Giardia* and 4 oocysts/100 L for *Cryptosporidium*. *Giardia* was found in tap water more often, and with higher levels, than *Cryptosporidium*. Ten protozoa positive samples out of 11 complied with bacterial criteria (table 1).

First, exposure was modelled according to several variables, including tap water intake and *Giardia* counts (in class). After a likelihood ratio test (LRT), exposure was modelled according to a quantitative variable, which combined individual tap water intake and *Giardia* counts (Ln transform), called *Giardia* “dose”. The odds ratio (OR) associated with a unit

increase of the *Giardia* “dose” is : OR = 1.76 (95 percent confidence interval : 1.21, 2.55) after adjustment on several covariates : community, age, compliance with bacterial criteria (dummy variable), presence or absence of 2 viral markers (enterovirus and astrovirus) (dummy variables). Home characteristics, gender, presence of rotavirus or of *Cryptosporidium* (unfortunately, *Cryptosporidium* data were too scarce for analysis) showed no association with incidence of ADC (table 2). In other words, assuming a water consumption of 2 L/d, ingestion of one cyst of *Giardia* is associated with a risk OR=1.58 (95 percent confidence interval : 1.51, 2.13); or, OR=1.86 (95 percent confidence interval : 1.44, 1.91), for consumption of 1 L/d.

Figure 2 exhibits excess risk estimates (in percent, with 95 percent confidence interval limits) derived through the Rendtorff experiment and through the OR stemming from the E.M.I.R.A. study. Calculation were developed with a Monte Carlo simulation, with parameters shown in table 3. Data are presented according to increasing numbers of *Giardia* cysts counts; the x axis is limited to the domain of *Giardia* counts that were found during the study. It is apparent that both risk curves overlap perfectly ( $R^2 = 99$  percent) under the assumption that 20 percent of the detected cysts are capable to induce disease.

## Discussion

The important hazard that *Giardia* and *Cryptosporidium* pose to communities supplied by surface water has been early recognized by the US legislation, which requires a minimum of three log removal/inactivation of *Giardia* and two log removal of *Cryptosporidium* [32]. These objectives were derived after a proposal of Regli *et al* (1991) stating that consumers should receive treated water associated with a risk of infection lower than one per 10 000 individuals per year [17; 29]. In the UK, the "Drinking Water Inspectorate" also takes into account *Cryptosporidium* risks, requiring a maximum level of 10 oocysts/100 L. New UK regulations also require that water providers perform a risk assessment on their water treatment facilities and implement continuous monitoring for *Cryptosporidium* [33]. In continental Europe, no rules exist for *Giardia* or *Cryptosporidium*, including in the new European Directive on drinking water (1998) [34].

While risk assessment is very valuable for management of waterborne infectious risks, it is affected by several uncertainties : there are gaps in knowledge about pathogens

concentrations, imprecisions in population exposure assessment, and weaknesses in specification of dose-response functions, amongst other factors [35]. The importance of systematically distinguish and evaluating various sources of uncertainty was identified by Havelaar (1998) [5] and developed by Fewtrell (2001) [35].

Dose-response data for infection with *Giardia lamblia* were reported more than 40 years ago (Rendtorff, 1954), and were performed on healthy adult hosts, which is not the most important group from a public health perspective [4]. The E.M.I.R.A model for *Giardia* risk was based on a panel that included some sensitive subpopulations (i.e., children, elderly subjects, pregnant women, but no subjects with chronic disease), which are excluded from experiments for ethical reasons. This feature presents some importance as several outbreaks (as in Las Vegas or Milwaukee) showed that disease mainly affected sensitive population [36] who are more likely to develop symptoms, once they have become infected. Gerba *et al* [36] assessed that this subgroups currently represent almost 20 percent of the US population [37].

Compared to previous reported studies where pathogens concentrations were often measured in raw water samples [35], our survey provided directly drinking water data; so we did not need to formulate additional hypotheses on germs survival at early steps of the water supply chain. The detection method we used, however, does not differentiate between live, virulent and non infectious micro-organisms, nor is it strictly specific of human strains of parasites. In addition, the imperfect recovery of cysts from water samples makes interpretation of count data difficult. Thus, only a fraction of the detected parasites might be viable, infectious and virulent for humans [5]. Several measures of viability have been proposed in the literature, such as germ morphology [27], *in vitro* excystation assays, or infectivity tests in animal models [4]. No assay on viability/infectivity was conducted within the E.M.I.R.A framework. Teunis *et al* (1997) reported that *Giardia* cysts shedding might occur at very low infectious doses (3-10 cysts) [4]. In our study, *Giardia* cysts were found at non negligible levels in tap water (10, 20, 30 and 110 cysts per 100 L). Other critical issues in exposure assessment should also be discussed. We hypothesised that one water sample represented the average parasitological quality of water during 7 days. A recent study showed small differences in *Giardia* cysts counts along consecutive days [38], suggesting that our samples representativeness may not be so bad. Further, the latency for *Giardia* infection and disease is commonly reported to be comprised between one and 14 days. Thus, the seven days morbidity period we chose might be incomplete; it showed the best statistical associations,

however. Exposure to waterborne pathogens depends upon infectious micro-organisms concentration, but also on the amount of water that is ingested. Most risk assessment studies use 2 L as the default value for daily drinking water intake, even if a detailed US survey indicated a median consumption of tap water of 0.96 per day (L/d) and a 97.5 percentile of 2.95 L/d [39]. Here, we applied the consumption values that were declared by the study volunteers for tap water.

The current dose-response function available for *Giardia* is based on the Rendtorff experience (1954) [21]. The exponential model fits better the data than the more elaborate beta-Poisson curve, an intriguing feature since the beta-Poisson model allows for variations in the probability of infection (which results from differences in infectivity between individual parasites, or in the degree of host resistance) [4]. This model, which is used commonly in the literature is considered to be conservative. Detection methods for (oo)cysts in this experiment did not discriminate for viable and/or infectious parasites; therefore, each positive event was assumed to be infectious. This study did not account either for the role of past exposures and their ability to offer a protective effect [29].

It is reasonable to think that the association between digestive morbidity and *Giardia* exposure differs according to age. We could not assess this heterogeneity because of lack of statistical power. The literature does not provide such information either, and this requires further research. It should be noted that our risk estimates for *Giardia* are adjusted for other concomitant pathogens (i.e., viruses), a situation that occurred during the true outbreak that was observed. They are consistent with those derived after the Rendtorff model, provided that we down-weight the measured germ counts by a factor of 20 percent. This parameter encompasses several dimensions: (i) the recovery rate of the analytical techniques is not 100 percent (with the Gelman® protocol used here this rate average 50 percent); (ii) some detected cysts might be non viable and non infectious to humans; (iii) some infected subjects might be asymptomatic. It is difficult, and out of the scope of this study, to devise what role these different factors play, in the net 20 percent weigh. For instance, one could hypothesise that the incidence rate would have been greater in this general population, had the viability and infectivity characteristics of the germs in the natural environment been larger than those assayed in the Rendtorff experience. By contrast, human experiences are free from these considerations, which rendered necessary to account for this important difference. Le Chevallier *et al* (1991) had found that 13.3 percent of the detected cysts had a viable

morphology [27]. A probability of disease when infected about 70 percent (95 percent confidence interval : 35, 100) was assessed for *Cryptosporidium* in a recent study [8]. For *Giardia*, symptomatic infections proportions have been reported ranging between 50 percent and 67 percent and as high as 91 percent [3].

While substantial efforts are ongoing to improve risk assessment of *Cryptosporidium*, because of its well established virulence for immunocompromised subjects, little is done for *Giardia*, yet several studies showed a greater risk of infection with *Giardia* than with *Cryptosporidium* [4]. The E.M.I.R.A study had been designed to deal with the 2 protozoa, but presence of *Cryptosporidium* in tap water of our French communities was too rare an event for analysis. Evidence of consistency between estimated and observed germ counts after the Milwaukee *Cryptosporidium* outbreak also gives some support to the validity of risk parameters that were computed through clinical infection assays; we suggest, however, that studies along the same rationale as the E.M.I.R.A. study could be designed to assess dose-response functions for this pathogen, in a non-epidemic context, because waterborne exposure to protozoa may not necessarily result in outbreak situations, as it was seen in the present study. In another recent study, in Sydney (Australia), raw and finished water were contaminated by *Cryptosporidium* and *Giardia* without discernable increases in illness in the general population [40]. It is well known, however, that only a very small fraction of individuals with acute digestive conditions present ask for medical attention and are adequately diagnosed and registered [8].

## **Conclusion**

Quantitative microbial risk assessment is a useful tool for a better control of waterborne infectious risks associated with emerging pathogens such as some enteric viruses and protozoa. This study, conducted in a general population in a natural setting, showed that the exponential model for waterborne *Giardia* risk computed from clinical experiments data is consistent with epidemiological data. However, much remains to be learned as to key characteristics as germ viability, infectivity and virulence, in these natural environments. Progress in analytical techniques will allow to refine these risk parameters.

## **Acknowledgements**

To Central Laboratory of the Générale des Eaux (Vivendi Waters), the French Ministry of Environment (research program 'Health and Environment'), and the French Water Agencies, provided financial support to this study. The authors thank Pr Ph. Hartemann, from the Department of Environment and Public Health of Nancy University; L. Belleville and A. Guilloud, from the Local Services of the Ministry of Health; Pr J-M Seigneurin, Dr B. Gratacap-Cavallier and O. Genoulaz, from the Molecular Medical Virology Laboratory of Grenoble University Hospital; Dr P. Chevallier and Mrs Bouvier, from the Regional Laboratory of Water Analysis, Veronique Dille from the Générale des Eaux., and Franck Balducci from the Public health Laboratory of Grenoble Medical School, for their technical assistance. Authors are especially grateful to Eric Da Silva from the CAREPS, Grenoble University Hospital, who was in charge of the phone calls for the health survey.

## References

- 1-Mac Kenzie W.R, Hoxie N.J, Proctor M.E *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med 1994, 331 : 161-167.
- 2-Frost F.J, Fea E, Gilli G *et al.* Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in southern Europe. Eur J Epidemiol, 2000, 16 : 385-390.
- 3-Rose JB, Haas CN, Regli S. Risk assessment and control of waterborne Giardiasis. Am J Public Health, 1991a, 81 :709-713.
- 4-Teunis PFM, Medema GJ, Kruidenier L, and Havelaar AH. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. Wat Res, 1997, 31 (6) : 1333-1346.
- 5-Havelaar AH. Emerging microbiological concerns in drinking water quality. In : Drinking water research 2000. Papers from a research conference, March 1998, held at the University of Warwick. Drinking Water Incorporate, London.
- 6-Eisenberg JN, Seto EYW, Olivieri AW, Spear RC. Quantifying water pathogen risk in an epidemiological framework. Risk Analysis, 1996, 16 (4) : 549-563.
- 7-Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O *et al.* Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the art water treatment. Ann Intern Med, 1996, 124: 459-
- 8-Perz JF, Ennever FK, Le Blancq SM. *Cryptosporidium* in tap water. Am J Epidemiol, 1998, 147 (3) : 289-301.

- 9-Rose JB, Gerba CP. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Wat Sci Techn*, 1991, 24 (2) : 29-34
- 10-Neumann DA, Foran JA. Assessing the risk associated with exposure to waterborne pathogens : an expert panel's report on risk assessment. *J Food Protection*, 1997, 60 (11) : 1426-1431.
- 11-Macler BA. Acceptable risk and U.S. microbial drinking water standards. **in** : Safety of water disinfection : balancing chemical and microbiological risks. CRAUN.G.F. (ed), ILSI Press, Washington DC. 1993. 619-623.
- 12-National Academy of Sciences, Safe drinking water committee. *Drinking water and health*. Washington DC : Natl Acad Press. 1977.
- 13-Haas CN. Epidemiology, microbiology, and risk assessment of waterborne pathogens including *Cryptosporidium*. *J Food Protection*, 2000, 63 (6) : 827-831.
- 14-Haas C,N. Estimation of risk due to low doses of micro-organisms : a comparison of alternatives methodologies. *Am. J. Epidemiol*, 1983, 118 (4) : 573-582.
- 15-Haas CN. Quantifying microbiological risks. **in** : Safety of water disinfection : balancing chemical and microbiological risks. CRAUN.G.F. (ed), ILSI Press, Washington DC. 1993, 389-398.
- 16-Haas CN; Rose JB; Gerba C, Regli S. Risk assesement of virus in drinking water. *Risk analysis*, 1993, 13 (5) : 545-552.
- 17-Regli S; Rose JB; Haas CN, Gerba.CP. Modeling risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *JAWWA*, 1991, 83 : 76-84.
- 18-Rose JB. Waterborne pathogens : assessing health risks. *Health Environ Digest*, 1993, 7 (3) : 1-3.
- 19-Vose DJ. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J Food Prot*, 1998, 61 (5) : 640-648.
- 20-Haas C.N.; Crockett CS; Rose JB; Gerba CP, Fazil AM. Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *Journal AWWA*. 1996. 131-136.
- 21-Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. 1. *Giardia* cysts given in capsules. *Am J Hyg*, 1954, 59 : 209.
- 22-Dupont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, and Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med*, 1995, 332 (13) : 855-859.
- 23-Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree KD. Waterborne rotavirus : a risk assessment. *Wat Res*, 1996**b**, 30 (12): 2929-2940.

- 24-Haas C.N., Rose J.B. Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology : the case of the Milwaukee outbreak. Proc. Ann. Conf. AWWA. New York, 5-9 June 1994. 517-522.
- 25-Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavailler B, Genoulaz O *et al.* A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water [EMIRA Study]. Water Sc Technol, 2001a (in press).
- 26-Gofti-Laroche L, Joret JC, Demanse D, Zmirou D. Assessment of the parasitical quality of drinking water and risks of endemic infectious digestive conditions (E.M.I.R.A study). ASM 101<sup>st</sup> General Meeting, May 20-24, 2001b, Orlando, Florida.
- 27-Le Chevallier MW, Norton WD, Lee RG. *Giardia* and *Cryptosporidium* in filtered drinking water supplies. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (9) : 2617-2621.
- 28-Cervantez P, Robert C, Mennecart V, Compagno B and Joret J.C. J Europ Hydrologie, 1997, 28 (2) : 155-172.
- 29-Barbeau B, Coallier J, Clément B and Prévost M. Evaluationg the risk of infection from the presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. Proceedings, 1<sup>st</sup> IWA World congress, Paris 3-6 July 2000.
- 30-Teunis PFM, Nagelkerke NJD, Hass CN. Dose response Models for infectious Gastroenteritis. Risk Analysis, 1999, 19 (6) : 1251-1260.
- 31-Burmaster DE and Anderson PD. Principles of good practice for the use of Monte Carlo techniques in human health and ecological risk assessments. Risk Analysis, 1994, 14 (4) : 477-481.
- 32-US-EPA. Office of ground water and drinking water. Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources. EPA report n°570/9-29-018, 1991. Washington DC.
- 33-Barrell RA, Hunter PR and Nichols G. Microbiological standards for water and their relationship to health risk. Commun Dis Public Health, 2000, 3 (1) : 8-13.
- 34-Directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (French).
- 35-Fewtrell L, Macgill SM, Kay D and Casemore D. Uncertainties in risk assessment for the determination of drinking water pollutant concentrations : *Cryptosporidium* case study. Wat Res, 2001, 35 (2) : 441-447.
- 36-US-EPA. Report to congress. EPA studies on sensitive subpopulations and drinking water contaminants. December 2000. [www.epa.gov/safewater](http://www.epa.gov/safewater)

- 37-Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Sensitive populations : who is at the greater risk ? Int J Food Microbiol, 1996a, 30 (1-2) : 113-123.
- 38-Payment P (b), Berte A, and Fleury C. Sources of variation in isolating rate of *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. Can. J. Microbiol. 1997, 43 : 687-689.
- 39-Roseberry AM., Burmaster DE. Log normal distributions for water intake in children and adults. Risk Analysis, 1992, 12 : 99-104.
- 40-Hellard ME, Sinclair MI, Forbes AB, Fairley CK. A randomized blinded controlled trial investigation the gastrointestinal health effects of drinking water quality. Environ Health Perspect (in press).

Figure 1 : Description of the method using Monte Carlo simulation used to evaluate the risk of infection with *Giardia*

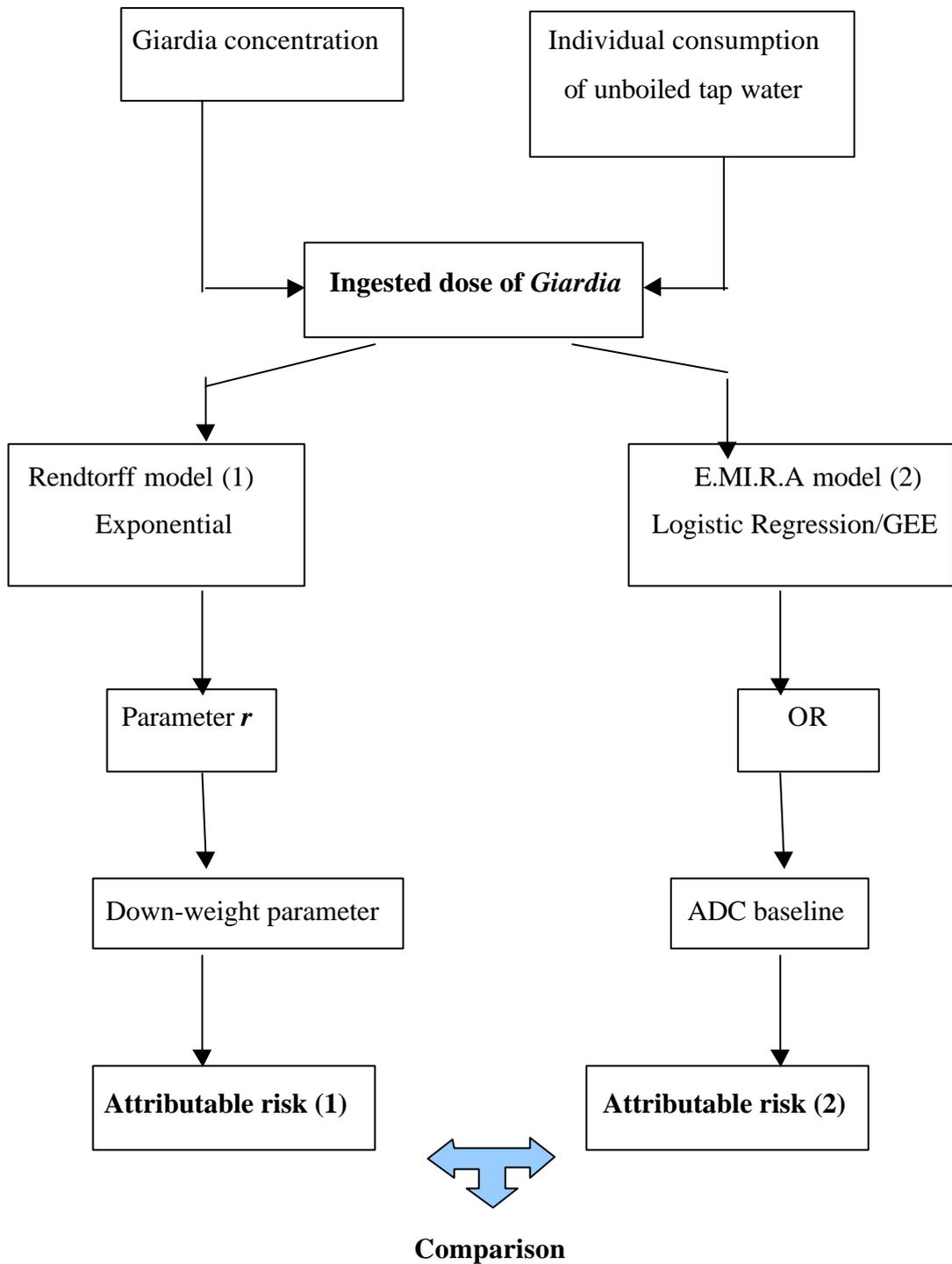


Table 1 : Microbiological surveillance of tap water

|         | Group 1   |   |   |    | Group 2   |          |   |    | Group 3   |          |   |    | Group 4    |          |   |    |
|---------|-----------|---|---|----|-----------|----------|---|----|-----------|----------|---|----|------------|----------|---|----|
|         | G         | C | V | B* | G         | C        | V | B* | G         | C        | V | B* | G          | C        | V | B* |
| Run 1   | <         | < | < | -  | <         | <        | < | +  | <         | <        | < | -  | <          | <        | + | -  |
| Run 2   | <b>30</b> | < | < | -  | <b>10</b> | <        | < | -  | <         | <        | + | -  | <          | <        | + | -  |
| Run 3   | <         | < | < | -  | <         | <        | < | -  | <         | <        | < | -  | <b>110</b> | <        | < | -  |
| Run 4   | <b>10</b> | < | < | -  | <b>20</b> | <        | < | -  | <b>10</b> | <        | + | -  | <          | <        | + | -  |
| Run 5   | <         | < | < | +  | <         | <        | + | -  | <         | <        | + | -  | <          | <        | + | -  |
| Run 6   | <         | < | < | -  | <         | <        | < | -  | <         | <b>3</b> | < | +  | <          | <b>1</b> | + | -  |
| Run 7   | <b>10</b> | < | < | -  | <         | <        | + | +  | <         | <        | < | -  | <          | <        | + | -  |
| Run 8   | <         | < | < | +  | <         | <b>4</b> | < | -  | <         | <        | < | -  | <          | <        | < | -  |
| Alert 1 | <         | < | < | -  |           |          |   |    |           |          |   |    |            |          |   |    |
| Alert 2 |           |   |   |    |           |          |   |    |           |          |   |    | <          | <        | < | +  |
| Alert 3 |           |   |   |    |           |          |   |    | <b>10</b> | <        | + | -  |            |          |   |    |
| Alert 4 |           |   |   |    | <         | <        | < | -  |           |          |   |    |            |          |   |    |

\* < = under detection limit. G = Giardia counts; C = Cryptosporidium counts; V = no detection (<) or detection (+) of viral RNA (enterovirus, rotavirus, or astrovirus); B = compliance (-) or non compliance (+) to bacterial indicators

Table 2 : Variables of the multivariate analysis

| Variable name                 | Variable selected in the final model | Odds Ratio  | 95% Confidence Interval | P value      |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------|--------------|
| <b>Group (class)</b>          | Y                                    |             |                         |              |
| 2                             |                                      | 0.83        | [0.65-1.06]             | 0.13         |
| 3                             |                                      | 1.19        | [1.01-1.39]             | 0.03         |
| 4                             |                                      | 0.84        | [0.76-0.93]             | 0.001        |
| <b>Age (class)</b>            | Y                                    |             |                         |              |
| 5-14 years-old                |                                      | 0.90        | [0.69-1.18]             | 0.46         |
| 15-59 years-old               |                                      | 0.95        | [0.85-1.06]             | 0.36         |
| > 60 years-old                |                                      | 0.95        | [0.82-1.11]             | 0.54         |
| Gender                        | N                                    |             |                         |              |
| SES                           | N                                    |             |                         |              |
| Housing                       | N                                    |             |                         |              |
| Tap water intake              | Y                                    | **          | **                      | **           |
| <b>Bacterial Compliance</b>   | Y                                    | 0.81        | [0.64-1.02]             | 0.08         |
| <b>Enterovirus RNA (+/-)</b>  | Y                                    | 0.61        | [0.46-0.80]             | 0.0003       |
| Rotavirus RNA (+/-)           | N                                    |             |                         |              |
| <b>Astrovirus RNA (+/-)</b>   | Y                                    | 1.49        | [1.16-1.90]             | 0.002        |
| <b>Giardia counts (class)</b> | Y                                    | **          | **                      | **           |
| <i>Cryptosporidium</i> counts | N                                    |             |                         |              |
| <b>V*Ln(<i>Giardia</i>) *</b> | Y                                    | <b>1.76</b> | <b>[1.21-2.65]</b>      | <b>0.003</b> |

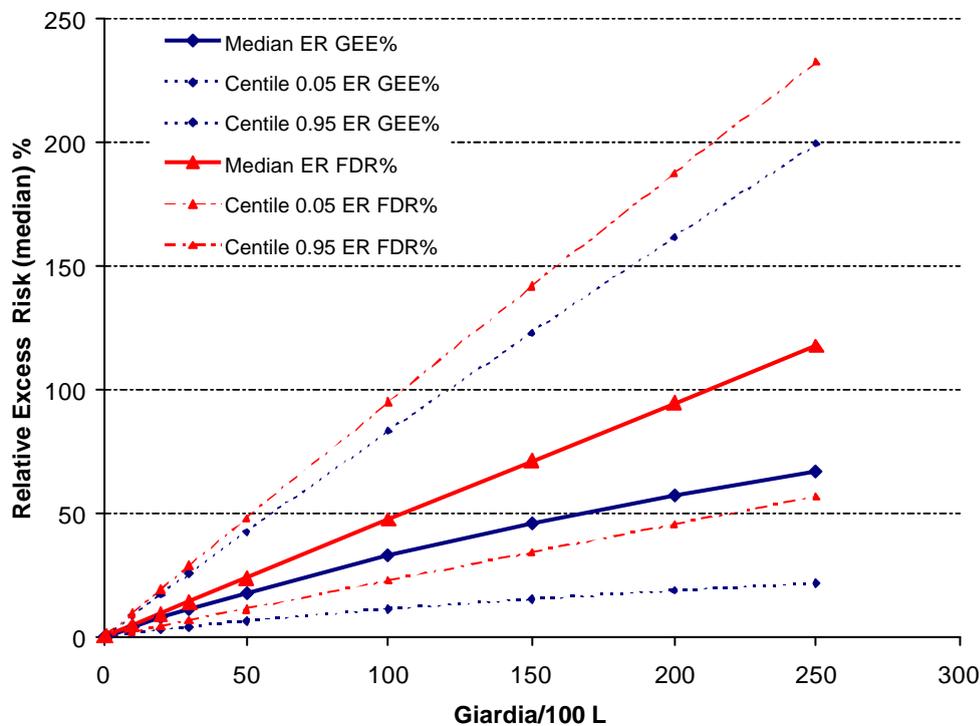
\* combination of tap water intake and *Giardia* counts

\*\* see parameter of V\*Ln(*Giardia*)

Table 3 : Summary of input variables and associated statistical distributions

| Input parameters                        | Variables      | Distribution | Parameters                                    |
|---|----------------|--------------|---|
| Tap water <i>Giardia</i> concentrations | C              |              | [0-250]/100 L                                 |
| Daily unboiled tap water intake         | V              | Log Normal   | $\mu= 0.8; \sigma= 0.3$ L/d                   |
| Rendtorff parameter                     | <i>r</i>       | Triangle     | Most likely =0.0198,<br>min=0.0098, max=0.036 |
| Ponderation parameter                   | P              |              | 20%   |
| GEE parameter                           | OR = $e^\beta$ | [1.21-2.55]  | 1.76  |
|   | $\beta$        | Normal       | $\mu= 0.56; \sigma=0.19$                      |
| Baseline incident rate                  | $I_0$          |              | $6.63 \cdot 10^{-3}$                          |

Figure 2 : Relative excess risk (in %, with 95% confidence interval) attributable to *Giardia* counts in tap water: comparison of the E.M.I.R.A GEE and the experimental exponential model



## 4-DISCUSSION

### 4.1-Rappel des principaux résultats

#### 4.1.1-La caractérisation de l'exposition hydrique aux micro-organismes

La contamination de l'eau par des marqueurs viraux et/ou parasitaires est un phénomène régulièrement observé au cours de l'étude : 28% (19/68) des échantillons d'eau (eau brute et robinet confondus) étaient positifs pour au moins un des virus recherchés, et 31% (11/36) des échantillons d'eau (eau du robinet) l'étaient pour au moins un des protozoaires recherchés. Les ARN d'entérovirus et d'astrovirus recherchés dans le cadre de cette étude étaient des entérovirus ou des astrovirus humains, ne pouvant donc provenir que d'une pollution de l'eau d'origine humaine (eaux usées essentiellement). Les séquences génétiques de rotavirus recherchés étaient en revanche communes à des virus humains ou animaux. Le séquençage des astrovirus n'a pas pu être réalisé faute de matériel génétique suffisant. Le séquençage des rotavirus a été réalisé pour certains prélèvements concomitants du pic épidémique et pour les prélèvements de la campagne supplémentaire de février 2000 et a toujours mis en évidence l'origine bovine des rotavirus détectés. D'une manière plus générale, les résultats virologiques de cette étude mettent en lumière une circulation de génome viral dans l'eau et posent la question, comme le soulignent certains auteurs, du rôle possible du milieu hydrique dans les recombinaisons génétiques entre virus, avec d'éventuels passages entre souches animales et humaines (Gratacap-Cavallier, 2000).

Les kystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* étaient également susceptibles de provenir d'une pollution humaine ou animale. *Giardia* a été fréquemment mis en évidence dans l'eau du robinet des communes d'étude, contrairement à *Cryptosporidium*. Cependant, la situation était inverse au cours de l'étude pilote, y compris au cours de la même saison, et ne nous permet donc pas de conclure sur ce point. La recherche plus spécifique de *Cryptosporidium parvum* a été tentée, mais n'a pas pu être conduite à son terme faute d'échantillons suffisamment contaminés.

Les enquêtes de consommation d'eau de boisson ont fourni des données utilisables dans le cadre d'études épidémiologiques ou d'évaluation du risque pour une meilleure estimation quantitative de l'exposition des individus. Les valeurs moyennes ainsi que les valeurs de percentiles 95 issues de ces enquêtes sont sensiblement supérieures à celles des précédentes

enquêtes anglo-saxonnes. Les données portant sur la consommation d'eau du robinet ont permis d'affiner la modélisation de la morbidité digestive en fonction de la mesure des pathogènes hydriques. La distribution de la consommation d'eau du robinet consommée pure, c'est à dire sans modification ni transformation, a pu par la suite être intégrée dans les excès de risque calculés par la simulation de Monte-Carlo, et présentés dans l'article VI.

#### ***4.1.2-la surveillance sanitaire***

De nombreux auteurs estiment que les statistiques des maladies infectieuses d'origine hydrique sont largement sous-estimées, à la fois pour les épidémies et tout particulièrement pour les faibles niveaux d'expression endémiques (Ford, 1999 et Frost 1996 : Frost FJ, Craun GF, Calderon RL. Waterborne disease surveillance. *JAWWA*:66-75, 1996). En France, la littérature fait souvent état du faible nombre d'épidémies hydriques rapportées, et souligne comme cause possible la faiblesse de la veille épidémiologique (Hartemann, 1986). Pourtant, le suivi épidémiologique intensif réalisé auprès des 544 volontaires n'a permis d'observer au cours des 9 mois d'enquête qu'un seul pic épidémique d'intensité modérée, et ce en dépit de la vulnérabilité des ressources et des niveaux assez élevés de contamination de l'eau par des marqueurs viraux et parasitaires. Le Chevallier (1991) a fait le même constat avec la fréquente contamination de l'eau de boisson par *Cryptosporidium*. L'incidence des gastro-entérites (répondant à la définition de la littérature des "Highly Credible Gastro-Enteritis") observée au cours de l'étude E.MI.R.A se situe autour de 0.20 cas par personne et par an (cas/p-an), ce qui est relativement faible comparé à ce qui a été observé au cours d'autres études épidémiologiques : 0.45 cas/p-an en Hollande (Teunis, 1999), et 0.80 cas/p-an à Melbourne (Hellard, Sinclair, 2000). Il apparaît donc, contrairement à l'hypothèse de départ, que la morbidité digestive s'exprimerait plutôt sur un mode endémique que sur un mode épidémique. Ce résultat confirme celui de travaux antérieurs sur le risque bactériologique hydrique mené dans les années 80 par l'équipe grenobloise (Zmirou, 1987; et 1995). Pour autant, si elle a conduit à modifier la stratégie d'analyse des données, cette faible expression épidémique de la morbidité digestive n'a pas empêché l'étude de la relation entre les pathogènes faisant l'objet de cette recherche, et les troubles digestifs aigus observés.

#### ***4.1.3-L'analyse multivariée des données longitudinales***

Les virus entériques et protozoaires qui ont fait l'objet du suivi sont inégalement associés au risque sanitaire. L'analyse a fait apparaître une association positive entre la présence d'ARN d'astrovirus et la morbidité digestive des volontaires (OR = 1.51, IC95%, [1.17-1.94]) ; il en

est de même pour les kystes de *Giardia* (OR = 1.19, IC95%, [0.96-1.48] pour des concentrations comprises entre 10 et 20 kystes/100 l; OR = 1.24, IC95%, [1.06-1.45] pour des valeurs supérieures à 20 kystes/100 l). Ces résultats sont robustes : le sens et l'intensité de ces associations restent constants quelque soit le choix des autres prédicteurs inclus dans les modèles GLM et GEE.

Les astrovirus semblent donc avoir un rôle non négligeable dans la morbidité digestive "bénigne" en population générale, comme souvent décrit dans la littérature (Belliot, 1997), qui s'exprimerait ici essentiellement sur le mode endémique. Les entérovirus, qui n'ont pas véritablement d'effet pathogène propre sur la sphère digestive, ont été choisis pour évaluer leur intérêt comme indicateurs de contamination virale. Leur présence dans cette étude n'a pas été associée à une augmentation des troubles digestifs, et ils se sont révélés dans ce contexte de mauvais indicateurs du risque viral ; ils sont paradoxalement statistiquement associés à une diminution du risque (OR = 0.60, IC95%, [0.45-0.80]). Cet effet apparemment négatif est sans doute un artéfact lié à une discordance temporelle entre la présence des entérovirus (non pathogènes) et celle des astrovirus et des *Giardias*, qui eux, sont associés à une augmentation des troubles digestifs. L'impact sanitaire des rotavirus apparaît nul pour l'ensemble des volontaires (OR = 0.95, IC95%, [0.74-1.23]), mais une tendance positive est possible pour la classe des 0-4 ans (OR = 1.52, IC95%, [0.76-3.03]). Ce travail ne peut pas pour autant conclure à l'implication sanitaire des rotavirus d'origine bovins qui ont été détectés. L'absence d'association est sans doute liée au fait que la présence des rotavirus est également en antiphase avec celle des astrovirus et celle des *Giardias*, ce qui peut conduire à masquer leur effet propre, par ailleurs bien décrit dans la littérature. Quant à *Giardia*, si son implication dans les épidémies de gastro-entérites n'est plus à démontrer; la mise en évidence, dans cette étude, de son rôle dans l'élévation du bruit de fond de troubles digestifs aigus est intéressante à souligner. Ce résultat va dans le sens de différentes enquêtes réalisées aux Etats-Unis qui suggèrent que les eaux non traitées ou simplement traitées par désinfection chlorées constituent vraisemblablement une cause importante d'infections endémiques à *Giardia* (Isaac-Renton, 1996; et 1999). Enfin, ce travail ne peut pas conclure sur le rôle de *Cryptosporidium* compte tenu du faible nombre d'échantillons positifs.

La comparaison des excès de risque de troubles digestifs calculés à partir de la modélisation des données de cette étude et à partir de la fonction dose-réponse de Rendtorff (1954) pour

*Giardia*, répond à l'objectif initial du programme de recherche. Le modèle de fonction dose-réponse construit sur la base de l'étude épidémiologique fournit, sous réserve de notre hypothèse sur le facteur de pondération (fixé à 20%, en combinant, comme on le verra plus loin, le rendement des techniques, l'incertitude sur la viabilité, l'infectivité pour l'homme et la virulence des kystes détectés), des estimations de risque sanitaire étonnamment proches de celles fournies par le modèle expérimental ( $R^2 > 99\%$ ), ce qui permet de conforter la confiance que les évaluateurs et gestionnaires du risque accordent à ce modèle déjà largement utilisé pour le protozoaire *Giardia*, dont on rappelle ici l'équation :

$$P = FP * [1 - \exp(-r \cdot \text{Dose})]$$

Où : P = Probabilité individuelle journalière de trouble digestif

FP = Facteur de pondération, fixé ici à 20%;  $FP (\%) = R * \text{Via} * \text{Inf} * \text{Vir}$ ;

avec R = rendement de la technique de détection, Via = estimation de la proportion de kystes détectés viables, Inf = estimation de la proportion de kystes détectés infectieux pour l'homme, Vir = virulence des kystes détectés, i.e., leur capacité à générer des signes cliniques après l'infection.

r = Paramètre caractérisant le devenir de *Giardia* dans l'organisme, soit 0.02 (Rendtorff, 1954)

Dose = C\*V, avec C = Concentration de kystes par litre d'eau de robinet, et

V = Quantité individuelle d'eau de robinet consommée, en litre par jour

Ce travail n'a pas pu être mené pour les virus de l'étude. Les techniques de détection semi-quantitatives n'ont pas permis de retrouver un nombre suffisamment varié et contrasté de niveaux de concentration des virus dans l'eau. Ce travail pourra cependant être engagé à l'avenir, grâce aux techniques de PCR quantitatives qui sont en cours de développement et de validation.

## 4.2-Discussion générale

Des éléments de discussion ayant trait aux différents volets de cette étude, notamment les résultats des enquêtes de consommation d'eau de boisson, la responsabilité des virus dans la morbidité observée, la construction de la fonction dose-réponse de *Giardia*, et les intérêts et les limites du suivi longitudinal prospectif, sont développés dans la section correspondante,

respectivement, des articles II, III à V, VI, ainsi que dans le chapitre d'ouvrage "Prospective epidemiological study" figurant en annexe 11. La présente discussion tentera d'aborder des aspects plus généraux. Elle comporte en premier lieu une critique de la validité du protocole et des données collectées.

#### ***4.2.1-Critique de la validité des données recueillies dans le cadre de l'étude E.MI.R.A***

Les données de morbidité digestive recueillies dans le cadre de cette étude nous semblent d'excellente qualité grâce au suivi intensif de l'état de santé de la population volontaire. Le recueil rétrospectif hebdomadaire de données sanitaires sur la base d'un enregistrement quotidien est reconnu comme optimal, compte tenu de la faible gravité des troubles et des limites de la mémoire (Byass, 1994). La qualité des observations issues de la surveillance épidémiologique est pourtant susceptible d'avoir été altérée par la durée relativement longue du suivi, générant sans doute des sur-déclarations au début du recueil, et un "essoufflement" en fin de parcours. Cependant, nous avons veillé à cet effet possible, en ne tenant pas compte des données sanitaires de la première semaine de suivi, en réalisant un recueil "actif" des données grâce à un enquêteur téléphonique formé, et en réalisant périodiquement des opérations de communication sur l'état d'avancement de l'étude (presse et courriers personnels).

La représentativité des données issues de la population d'étude, inclus sur la base du volontariat, est certes limitée, comme l'indiquent une structure par CSP et une structure par âge différentes de celles de la population générale, sanction habituelle de l'appel à volontaires. Pour des raisons éthiques évidentes, nous avons exclu les personnes porteuses d'une maladie chronique et/ou immunodéprimées. La population étudiée conserve cependant un intérêt certain pour la construction d'une fonction dose-réponse dans la mesure où elle présente une diversité qui approche celle de la population générale (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes âgées), ce qui est loin d'être le cas des populations volontaires ayant fait l'objet des expérimentations cliniques. En terme de Santé Publique, les jeunes adultes ne sont en effet pas le groupe le plus pertinent, alors que les personnes sensibles sont celles pour lesquelles les conséquences sanitaires ont toujours été les plus péjoratives (Mac Kenzie, 1994; Goldstein, 1996; Haas, 2000). Ce point sera revu plus loin. (§ 4.2.2).

Le choix de ressources particulières, non représentatives de l'ensemble des réseaux de distribution en France (vulnérabilité de la ressource, désinfection chlorée sommaire),

n'affecte pas, selon nous, l'intérêt plus général des résultats de ce travail, dès lors qu'ont pu être caractérisées les concentrations des pathogènes dans les eaux distribuées, lesquelles s'avèrent associées à l'incidence de la morbidité digestive parmi les consommateurs. En revanche, les données de ce travail ne permettraient pas l'appréciation des risques sanitaires encourus en aval d'une station de traitement conventionnelle si seules étaient connues les concentrations de pathogènes avant traitement. Trop d'incertitudes demeurent sur les facteurs d'abattement réalisés par les divers types de traitements, et il s'agit là d'un autre domaine de recherche.

Les données d'exposition des volontaires E.MI.R.A aux pathogènes hydriques, en revanche, sont entachées d'incertitudes sérieuses. Ces incertitudes sont liées, d'une part, aux problèmes de représentativité de l'échantillonnage (analyses ponctuelles/ attribution hebdomadaire) ; une récente étude a cependant montré une variabilité de la qualité parasitologique de l'eau plus faible que ce qui est communément supposé (Payment, 1997). Elles sont liées d'autre part, aux limites actuelles des techniques de détection des pathogènes dans l'environnement qui ne permettent, ni pour les virus, ni pour les protozoaires, de disposer d'informations sur leur caractère viable et infectant pour l'homme (Cervantez, 1997). Cela constitue la principale limite dans l'interprétation des données et dans l'estimation de l'impact sanitaire de ces pathogènes. Différentes méthodes d'estimation de la viabilité des kystes de protozoaires sont proposées (sur la base de la morphologie, par excystation *in vitro*, ou par un modèle d'infectivité animale), mais la recherche dans ce domaine reste à développer (Teunis, 1997). Pour les virus cependant, certains auteurs considèrent raisonnable de penser qu'un ARN détecté par RT-PCR correspond à la présence d'une particule virale complète dans l'échantillon (Gratacap-Cavallier, 2000). La présence parfois concomitante des différents germes peut rendre plus difficile de discerner le rôle isolé de chacun d'eux sur la morbidité digestive observée. Pour une part, l'analyse multivariée permet de prendre en compte ce phénomène ; un autre facteur favorable est que cette concomitance est somme toute assez modeste (cf tableau V du § 3.4.2, tableau VII et VIIbis du § 3.4.3). L'absence de données sur d'autres pathogènes, tels que les virus Norwalk-like, constitue également une faiblesse de l'étude. En effet, la littérature récente fait de plus en plus état du rôle prépondérant des calicivirus dans l'incidence de la morbidité digestive associée à l'ingestion d'eau potable contaminée (Beller, 1997; Kukkula, 1997; Häfliger, 2000; IAH web site). La recherche de ces virus était initialement prévue dans le protocole, mais il a fallu y renoncer pour des raisons financières. Malgré cela, la nature et la fréquence des analyses réalisées restent

particulièrement performantes dans ce champ de recherche, et sont uniques en France, à ce jour, dans le contexte d'une étude épidémiologique. Les laboratoires sollicités pour les analyses virologiques et parasitologiques, ont mis en œuvre les techniques de détection – validées - les plus élaborées à leur disposition au moment de l'étude de terrain.

Enfin, l'analyse s'est limitée aux données de TDA observés au cours de la semaine centrée sur le prélèvement d'eau, ce qui représente 36.4% seulement des données sanitaires. Cette perte de données se justifie donc par le souci de limiter les incertitudes pouvant entacher la mesure de l'association entre les résultats microbiologiques et leur effet possible sur la morbidité digestive des consommateurs. Le choix de l'indicateur de morbidité s'est porté sur les TDA plutôt que les GE. D'une part, les signes/symptômes digestifs inclus dans sa définition sont pertinents pour les pathogènes faisant l'objet de la recherche (Gerba, 1996; Teunis, 1999); d'autre part, cet indicateur est plus sensible bien que moins spécifique (15 fois plus de TDA recueillis que de GE).

#### ***4.2.2-L'estimation du risque infectieux associé à la qualité microbiologique de l'eau***

Bien que la littérature souligne le rôle non négligeable des virus entériques (rotavirus, astrovirus) et des protozoaires (*Giardia*, *Cryptosporidium*) d'origine hydrique dans l'incidence des gastro-entérites, l'estimation de leur impact sanitaire reste un exercice délicat. D'une part, la quantification de ces pathogènes dans l'eau est limitée par les techniques analytiques, en particulier par les difficultés à détecter les très faibles niveaux de contamination habituellement retrouvés dans l'environnement (Nicand, 1998) ; d'autre part, les signes cliniques induits manquent de spécificité ; enfin, la variabilité caractérisant le monde vivant rend difficile la généralisation de résultats acquis dans des conditions particulières. Notre travail met en cause les astrovirus et les *Giardias* véhiculés par l'eau de boisson dans l'augmentation de l'incidence de la morbidité digestive bénigne. Ces résultats nous semblent robustes, malgré les différentes limites du protocole exposées en § 4.2.1 ; pour autant, qu'en est il de leur généralisation ?

La morbidité digestive observée au cours de l'étude s'est exprimée essentiellement sur un mode endémique. En dépit de la vulnérabilité microbiologique des ressources, il n'a été observé qu'une seule «épidémie» véritable (nous entendons par «épidémie», au moins 2 cas incidents de TDA en 48h dans un groupe de 100 personnes environs alimentée par la même ressource). La faible «réactivité» des populations d'étude nous interroge sur

l'existence possible d'une protection acquise grâce à une immunité périodiquement re-stimulée, comme le suggère l'article récent de Frost (2000) pour *Cryptosporidium*. Dans ce contexte, le risque sanitaire encouru par une population non résidente (touristes, nouveaux immigrants, mais on pourrait aussi imaginer des retraités, des convalescents) exposée aux mêmes micro-organismes véhiculés par l'eau pourrait être alors beaucoup plus important, avec des risques relatifs largement supérieurs à ceux calculés dans notre population d'étude. D'une manière plus générale, dans des communes alimentées par une ressource vulnérable, faiblement traitée, connaissant des flux migratoires saisonniers (campeurs du Lac d'Aiguebelette en été par exemple), on pourrait redouter des manifestations morbides plus sérieuses que celles recueillies au cours de ce travail. De même, nos résultats ne reflètent sans doute pas l'impact sanitaire réel pour les personnes présentant une diminution, voire une absence, de réponse immunitaire. Or, ces personnes (très jeunes enfants, personnes âgées, personnes porteuses de pathologies chroniques, ou suivant des traitements immunosuppresseurs) sont celles pour lesquelles les épidémies documentées montrent que les conséquences sanitaires sont les plus graves, en terme de morbidité, et parfois même de mortalité (Teunis, 1997; Haas, 2000). La proportion de sujets sensibles est aujourd'hui estimée à 20% dans les pays développés, elle est supposée augmenter dans les années à venir (Gerba, 1996); aussi, la protection de ces groupes à risque constitue t-elle une préoccupation croissante de Santé Publique.

Les autorités sanitaires, conformément au principe de précaution, recommandent parfois l'arrêt de la consommation d'eau du robinet et le passage à l'eau embouteillée, pour les personnes les plus sensibles (DGS, 1997). Aussi peut on s'attendre dans quelques années à ce que des arguments de sécurité sanitaire soient avancés par les producteurs d'eaux embouteillées, mettant alors les distributeurs d'eau publique dans une situation délicate. Ce débat s'inscrit dans cette exigence croissante de sécurité qu'exprime l'opinion publique ; en réponse à cette exigence, il faut dorénavant être en mesure de quantifier les risques, et de les relativiser, ce qui ouvre la notion politiquement sensible du « risque acceptable ». Cette notion traduit la valeur d'équilibre entre ce qui est socialement et économiquement acceptable, et ce qui est techniquement faisable. Peu de pays sont rentrés de plain-pied dans cette logique. Un repère de risque acceptable a été fixé aux Etats-Unis à  $10^{-4}$  cas de gastro-entérites par personne-an (Macler, 1993), mais reste à débattre en Europe. Clairement, ce débat relève de considérations plus sociales et politiques que proprement scientifiques.

#### ***4.2.3-La discordance entre les marqueurs viraux et parasitaires et les indicateurs bactériens conventionnels***

Bien que les données françaises sur la qualité microbiologique des eaux de boisson soient très parcellaires, il y a lieu de penser - en se basant sur les statistiques publiées aux Etats-Unis - qu'une majorité des manifestations digestives endémo-épidémiques attribuables à l'eau de boisson sont liées à des contaminations virales ou parasitaires (Payement, 1991; MMWR, 1998). Or, ces micro-organismes peuvent persister malgré un traitement des eaux répondant aux critères bactériens classiques. Malgré leur apport considérable à la santé publique, les limites des indicateurs bactériens du risque fécal, outils majeurs de gestion du péril infectieux depuis des décennies, sont aujourd'hui mieux reconnues (Rose, Gerba, 1991; Goldstein, 1996; Kramer, 1996; Soule, 2000). Les communes sélectionnées pour l'étude sont caractérisées par des ressources certes particulières, avec des ressources vulnérables dans les groupes de communes 2, 3 et 4, et bénéficiant d'un traitement de désinfection simple. Il n'est pas possible, en conséquence, d'en tirer des enseignements ayant un caractère général. Cependant, les résultats des analyses microbiologiques de l'eau soulignent une discordance importante entre les indicateurs bactériens de contamination fécale et les ARN viraux et les protozoaires faisant l'objet de la recherche. Ces observations posent la question, aujourd'hui récurrente, de la validité de ces indicateurs en ce qui concerne le risque microbiologique non bactérien, et de la nécessité de les compléter par de nouveaux indicateurs plus représentatifs des différentes contaminations microbiologiques. Ce travail n'avait pas pour objectif de proposer de nouveaux indicateurs de surveillance de la quantité virologique ou parasitologique de l'eau, sujet d'actualité certes, mais qui relève d'autres approches, plus analytiques. Nous reviendrons sur ce point en tentant de dégager des perspectives de recherches au-delà de notre travail.

#### ***4.2.4-La construction épidémiologique des fonctions dose-réponse***

Le couplage temporel de l'incidence des TDA et des résultats microbiologiques de l'eau de boisson a permis la construction d'une fonction dose-réponse pour *Giardia*, ajustée sur différentes variables, tels que le réseau, l'âge (ce prend en compte, tout du moins, en partie, la variabilité du statut immunitaire), la consommation individuelle d'eau du robinet, et la présence de marqueurs de contamination microbiologique (bactéries et virus). Dans les conditions contrôlées de l'expérimentation humaine, les chercheurs sont dispensés de réaliser ce type d'ajustement. Cette contrainte de la modélisation de données issue d'une étude de terrain, génère certes de l'incertitude, mais elle permet, en retour, de s'affranchir des

difficultés inhérentes à l'extrapolation des fortes doses aux faibles doses, et/ou à la transposition des données d'une population de volontaires sains à une population générale présentant forcément des caractéristiques différentes. L'élaboration d'une fonction dose-réponse par l'expérimentation clinique conduit également à ne modéliser que le risque d'infection, c'est à dire dans le cas de *Giardia*, l'excrétion de kystes dans les selles. Bien que l'infection ne soit pas l'impact sanitaire le plus préoccupant, les auteurs considèrent que le risque de développer des signes cliniques présente une trop grande variabilité et qu'il est plus valide de s'intéresser à l'infection puisqu'elle constitue un pré-requis à la maladie (Haas et Gerba, 1988; Gerba, Rose, 1996). Ils préfèrent alors formuler au cas par cas les différentes hypothèses nécessaires pour estimer le risque de morbidité à partir de la probabilité d'infection (Haas, 1993; Haas et Rose, 1993). Ainsi, le travail original de Perz (1998) compare, à l'aide de la démarche d'évaluation du risque, les risques de cryptosporidiose prévisibles dans la population New-Yorkaise, et ceux réellement observés. Les estimations de morbidité sont basées sur des estimations concernant le rendement des techniques de détection de *Cryptosporidium* (< 50%), la viabilité (2 à 60%) et la pathogénicité (25 à 100%) des oocystes, paramètre qui incorpore leur viabilité/infectivité, leur virulence et la réponse de l'hôte. Le risque d'infection présente également l'avantage de remplacer le risque de maladie dans un scénario de "worst case" (Teunis, 1999).

La comparaison des modèles épidémiologique et expérimental a nécessité la prise en compte des différences qui ont présidé à l'élaboration de ces 2 modèles. Ainsi, la concentration de kystes introduite dans le modèle expérimental représente celle de l'ensemble des kystes, viables et infectants pour l'homme, présents dans le volume d'eau ingéré. Ce modèle ne fournit que la probabilité d'infection et non pas celle de morbidité, comme indiqué plus haut. Aussi, avons-nous appliqué au modèle exponentiel un facteur de pondération prenant en compte les incertitudes associées au rendement de la méthode analytique, à la viabilité/infectivité, et à la virulence des kystes détectés. La valeur du facteur de pondération (FP) a fait l'objet de plusieurs hypothèses. Nous avons testé FP = 100%, ce qui représentait l'hypothèse extrême selon laquelle tous les kystes présents dans l'eau étaient détectés, viables, infectants, et capables d'induire troubles digestifs. En fait, cette hypothèse permettait une comparaison "brute" des 2 modèles. Compte tenu des incertitudes relatives à l'ensemble des paramètres qui composent ce facteur, nous avons voulu tester une hypothèse simple, "moyenne", i.e., FP = 50%,. Enfin, nous avons testé une hypothèse qui nous paraît plus plausible au vu des estimations raisonnables relatives à chacun des paramètres : (1) le

rendement de la technique d'analyse utilisée dans le cadre d'E.M.I.R.A a été estimée par le Laboratoire Central de la CGE entre 50 et 80 % : nous avons choisi 70%; (2) la viabilité/infectivité des kystes a été proposée par la littérature se situe entre 15% (Le Chevallier, 1991; Teunis, 1997) et 60% (Perz, 1998) : nous avons choisi 30%; (3) la virulence des kystes est estimée entre 25 et 100% (Rose, 1991) : nous avons choisi 80%. Les infections à *Giardia* symptomatiques sont en effet estimées entre 24 et 61% selon l'âge, parfois entre 50 et 67%, voire même 91% (Rose, 1991). Peu de données sont disponibles en revanche sur la viabilité des *Giardias*, aussi avons-nous également tenu compte des données disponibles pour *Cryptosporidium* (entre 2 et 60%), dont on peut considérer que le comportement est proche de celui de *Giardia* (Rose, Slifko, 1999), et dont l'étendue traduit surtout l'incertitude qui pèse sur ce paramètre (Perz, 1998). La même source a estimé la pathogénicité de *Cryptosporidium* entre 25 et 100%. La valeur du facteur de pondération, qui ne peut dans le cadre de ce travail discerner la part réelle relative de ses différentes composantes, a donc été fixée sur la base de ces estimations à 20%, mais d'autres hypothèses sur la pathogénicité des kystes et sur la sensibilité de la population cible auraient pu être formulées et aboutir à la même valeur, ou à une valeur différente (comprise alors entre 2 et 50%). La connaissance de ces différents paramètres représente un domaine de recherche fondamental qui nous paraît devoir être poursuivi. Les distributions statistiques de ces divers paramètres pourront alors faire l'objet d'analyses probabilistes (à l'instar de l'analyse de Monte Carlo que nous avons conduite ici) qui donneront un fondement plus solide à la comparaison entre les diverses fonctions dose-réponse.

## 5-CONCLUSIONS

La question centrale à laquelle ce projet de recherche se proposait de répondre est celle de la validation épidémiologique des fonctions dose-réponse du risque viral et parasitaire, en vue de leur emploi dans le cadre de l'évaluation du risque microbiologique d'origine hydrique, puis de sa gestion. La fonction dose-réponse des rotavirus n'a pas pu être testée faute de niveaux de contamination des échantillons suffisamment contrastés, et la fonction dose-réponse des astrovirus n'a pu être construite pour les mêmes raisons. La contamination par *Cryptosporidium* a été trop rare pour permettre une modélisation mathématique. En revanche, le modèle de fonction dose-réponse construit pour *Giardia* conforte, sous réserve des hypothèses réalisées, le modèle expérimental proposé par Rendtorff (1954), qui est largement utilisé en évaluation du risque microbiologique hydrique.

L'approche épidémiologique visant à construire des fonctions dose-réponse nous semble pertinente dans une optique d'aide à la décision en Santé Publique, et tout à fait envisageable pour d'autres micro-organismes d'intérêt sanitaire, qu'ils soient véhiculés par l'eau ou aussi par l'alimentation solide. Ces "candidats" à la recherche pourraient être recrutés parmi les pathogènes ayant (ré)émergé ces dernières années, et pour lesquels les outils analytiques fiables sont disponibles, ou en cours de développement. Après l'émergence des *Giardia*, *C. parvum*, des Small Round Structured Viruses, et astrovirus, on observe aujourd'hui celle des Cyclosporas, *E. coli* 0:157 H 7, *L. pneumophila*, *V. cholerae* 0139, V.H.E, ou encore *H. pylori*. Ces pathogènes bouleversent la notion que l'on avait de l'eau comme véhicule de transmission, et s'inscrivent dans la problématique plus large des maladies infectieuses émergentes (le V.I.H, et l'agent de l'E.S.B en sont les plus illustres et redoutables représentants) qui représentent un nouveau défi à l'aube du XXIème siècle. Ainsi, en avril 1997, l'OMS avait choisi pour thème de la journée mondiale de la santé "Les maladies infectieuses émergentes : alerte mondiale, réponses mondiales", et le 27 janvier dernier (2001), un colloque de l'Institut Pasteur de Paris intitulé "Hygiène et Santé", présidé par le Professeur Grimont, alertait contre le recul de certaines mesures d'hygiène élémentaires. En effet, les succès incontestables du progrès médical et social (meilleures conditions d'hygiène, accès à l'eau potable et aux soins, campagnes de vaccination, avènement des antibiotiques) ont conduit à 'baisser la garde'. Une plus grande vigilance, et une moindre dépendance à l'égard des seules approches thérapeutiques anti-infectieuses, sont donc à nouveau de mise afin de préserver les acquis et de prévenir l'apparition de nouvelles pathologies infectieuses.

ANNEXES

**FICHE INDIVIDUELLE D'ENREGISTREMENT DE LA CONSOMMATION D'EAU DE BOISSON DU MARDI (ou jour de semaine) ET DU SAMEDI (ou dimanche)**

(Veuillez remplir une fiche pour chaque membre du foyer et nous les renvoyer par courrier dans l'enveloppe T ci-jointe)

Nom et prénom : ..... CODE :

Commune : .....

§ Veuillez indiquer (approximativement) votre consommation d'eau du robinet (1 verre équivaut à 20 cl) :

|                               | Consommation <b>dans la commune</b> du domicile (en nombre de verres) en distinguant : |                             |                             | Consommation totale <b>hors de la commune</b> (en nombre de verres) : |
|-------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|---|
|                               | Eau du robinet bue « pure » (sans modification)  | Eau ajoutée (sirop, jus...) | Eau chauffée (thé, café...) |   |
| Consommation du <b>mardi</b>  | ø  | ø                           | ø                           | ø   |
| Consommation du <b>samedi</b> | ø  | ø                           | ø                           | ø   |

§ Veuillez indiquer (approximativement) votre consommation d'eau embouteillée  
(1 verre équivaut à 20 cl) :

|                               | Consommation (en nombre de verres) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Consommation du <b>Mardi</b>  | ð                                  |
| Consommation du <b>Samedi</b> | ð                                  |

§ Au cours de l'étude, vous est-il arrivé d'arrêter provisoirement de boire l'eau du robinet ?

Je n'ai jamais arrêté de boire l'eau du robinet ð

Il m'est arrivé d'arrêter de boire l'eau du robinet ð

Si c'est le cas, pourquoi ? .....

.....