

# REPUBLIQUE DU SENEGAL

Un peuple - Un but - Une foi

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'EQUIPEMENT RURAL



**Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA)**

---

## FICHE TECHNIQUE :

### **Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxine (STEC) dans les viandes de buffle congelées commercialisées à Dakar**

A. A. Diallo <sup>\*\*\*</sup>, H. G. Hama, K. S. B. Sylla, F.T. Lô, M. Mbengue, M. Diouf, Y. Samb, R. B. Alambédji

<sup>\*\*\*</sup> **Contact :** Dr Alpha Amadou DIALLO, Chercheur Microbiologiste ISRA/LNERV Route du Front de Terre BP 2057 Hann - Dakar, Tel : +221 33 832 36 79, Cell : +221 77 657 56 57, Fax : +221 33 832 36 78  
Email : [alpha.diallo@isra.sn](mailto:alpha.diallo@isra.sn)

---

ISSN: 0850 - 9980

VOL 9, N°2

## I. Introduction

*Escherichia coli* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Les souches de *Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales (atteinte de l'appareil urinaire, du sang et du système nerveux central (O'Brien et al. 1983 ; Karmali et al. 1985 ; Johnson et al. 1983)).

Le pathovar des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'homme mais peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs. Le serotype O157:H7 est le plus fréquent pour les souches EHEC chez l'homme.

Le facteur principal de virulence d'EHEC est la Shigatoxine (Stx) (Stx ; également connue comme vérocytotoxine (Vtx), qui est une caractéristique des *E. coli* du groupe des « Shigatoxin producing *E. coli* » (STEC) auquel EHEC O157:H7 appartient).

Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés (viande de bœuf peu cuite, produits laitiers non pasteurisés), la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) et leur environnement (Crump et al. 2002 ; Grant et al. 2008) (Figure 1).

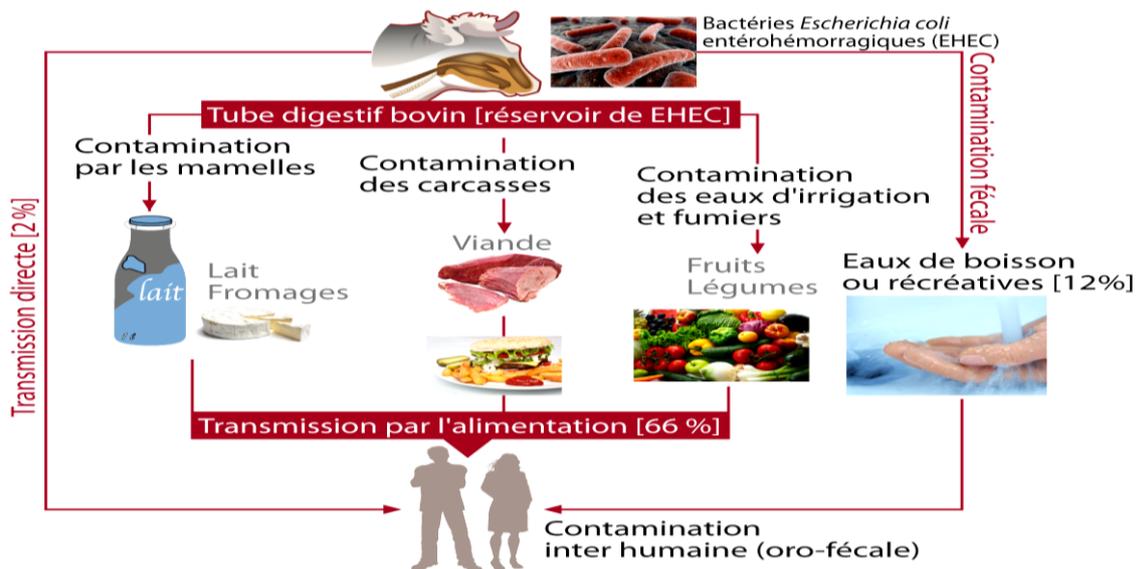


Figure 1. Les modes de transmission des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

Au Sénégal, après l'Arrêté ministériel n°7717 en date du 24 novembre 2005 portant interdiction d'importer des produits de l'aviculture et de matériels avicoles usagés, les acteurs de la filière pour s'adapter à cette nouvelle situation se sont tournés dans l'importation massive de la viande congelée particulièrement la viande de buffle. Les viandes de buffle, proviennent, en général, de l'Argentine et des pays du Sud-est asiatique, comme l'Inde, le Pakistan. L'importation est assurée en grande partie par des sociétés privées et des groupements d'intérêt économique(GIE).

L'objectif de ce travail est d'évaluer la qualité hygiénique des viandes de buffle commercialisées à Dakar par la recherche des souches de *Escherichia coli* pathogènes porteuses de gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* associés aux EHEC responsables de toxiinfections alimentaires.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Collection des échantillons

L'étude a été menée à Dakar et nous avons travaillé sur deux types d'échantillons de viande de buffle congelée. Les échantillons collectés par les Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA) lors des inspections après débarquement des conteneurs de viande au port et les échantillons que nous avons collecté dans cinq marchés à Dakar au niveau des étals des bouchers.

Tableau 1. Prélèvements de viande de buffle congelée par site

Sites	Nombre	Unité (g)	Quantité (g)	Température
SVPA	13	2 000	260 000	0 à -8°C
Sandaga	22	500	11 000	0 à 2°C
Tilène	30	500	15 000	1 à 6 °C
Gueul Tapé	17	500	8 500	2 à 11°C
Fass	15	500	7 500	0 à 1°C
Castor	3	500	1 500	1 à 3°C
Total	100		303 500	

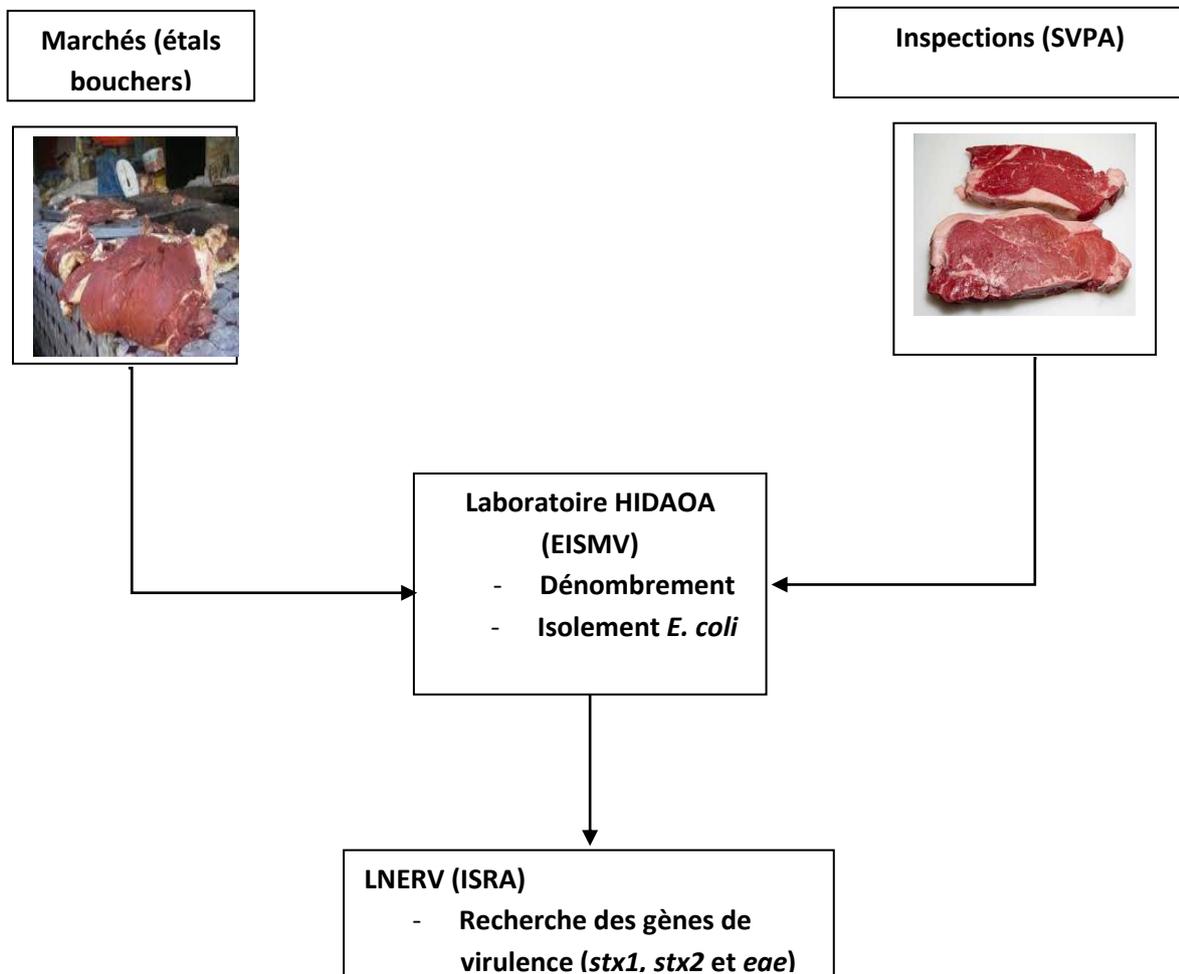


Figure 2. Démarche expérimentale

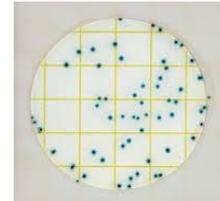
## II.2. Préparation des échantillons

Après réception des échantillons, 10g de viande sont pesés puis découpés en de très petits morceaux, et sont introduits stérilement dans un sachet Stomacher contenant 90 ml d'eau Peptonée Tamponnée (EPT) stérile, offrant la dilution au dixième. Le broyage s'effectue dans la machine Stomacher à 230 tours pendant 1mn30s. Les chocs dilacèrent le produit et mettent les germes en suspension. Le mélange homogène est alors laissé au repos pendant 30 mn, le temps de revivifier les bactéries avant l'étape du dénombrement.



## II.3. Dénombrement des *E. coli*

Des dilutions décimales des suspensions bactériennes ont ensuite été ensemencées sur pétrifilm Select *E. coli* (Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plate, Grosseron, Saint Herblain, France) pour le dénombrement des *E. coli*. Les pétrifilms sont incubés à 42°C pendant 18 à 24 heures (Vail et al. 2003)



## II.4. L'isolement et collection des souches de *E. coli*

Pour chacun des prélèvements, après dénombrement, des pétrifilm Select *E. coli* ont été ensemencés à une dilution permettant d'avoir des colonies bien isolées et présentant une activité bêta-glucuronidase ont été prélevées de façon aléatoire. Les colonies ont été repiquées individuellement dans des tubes Eppendorf contenant 500µL de bouillon Luria Bertani (LB) (Invitrogen, Paisley, Ecosse) pour la recherche des gènes de virulence associés aux EHEC. Au total 135 isolats de *E. coli* ont été collectés (Tableau 2)

Tableau 2. Collection de souches *E. coli*

Sites de prélèvement	Isolats de <i>E. coli</i>
SVPA	13
Sandaga	39
Tilène	33
Gueul tapé	26
Fass	20
Castor	04
Total	135

## II.5. Recherche des gènes de virulence associés aux EHEC

Les EHEC sont caractérisés par la présence de deux principaux facteurs de virulence qui sont les shigatoxines (STX) codées par les gènes *stx1* et *stx2* et l'intimine, le facteur d'attachement aux entérocytes codé par le gène *eae*. L'amplification génique a été réalisée par PCR triplex pour ces 3 gènes de virulence des EHEC (*eae*, *stx1* et *stx2*) comme décrite par China et al.1996 (Tableau 3). Les souches de référence MG1655 (U00096) et Sakaï (Hayashi, T., et al., 2001) nous ont été offertes gracieusement par l'Ecole National Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

Tableau 3. Les amorces utilisées pour la PCR multiplex

gènes cibles	Noms	séquences 5'-3'	Taille (Pb)	Références
<i>eae</i>	eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	570	China, 1995
	eae B53	CCATCGTCAACCAGAGGA		
<i>stx1</i>	SLT1 B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388	
	SLT1 B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG		
<i>stx2</i>	SLTII B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807	
	SLTII B57	GACATTCTGGTTGACTATCTT		

### III. Résultats

Le dénombrement des *E. coli* nous a permis d'avoir les résultats suivants : SVPA (5 UFC/ml), Sandaga (1,2.10<sup>2</sup> UFC/ml), Tilène (1,4.10<sup>2</sup> UFC/ml), Castor (1,60.10<sup>2</sup> UFC/ml), Fass (1,7.10<sup>2</sup> UFC/ml) et Gueule tapée (1,8.10<sup>2</sup> UFC/ml). Les limites du critère microbiologique pour la viande sont une limite inférieure de : <10 UFC/g et une limite supérieure de : 3.7 10<sup>8</sup> UFC/g.

**Tableau 4. Appréciation du taux de contamination des viandes par les souches *E. coli***

Classe	Nombre d'échantillons	Pourcentage	Norme AFNOR <i>E. coli</i> (UFC)
< 10	16	16%	5.10 <sup>2</sup> (UFC)
] 10 - 10 <sup>2</sup> [	78	78%	
] 10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup> [	6	6%	
10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	0	0	
> 5.10 <sup>4</sup>	0	0	
<b>Total</b>	100	100%	

Sur 100 échantillons analysés, pour le dénombrement des *E. coli*, 94% sont conformes aux critères de référence selon la Norme française comme l'illustre le tableau 4 ci-dessus.

Les résultats obtenus montrent que sur les 135 isolats de *E. coli* testés par PCR multiplex, 9 isolats portaient au moins un des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* recherchés soit une prévalence globale de 6,66%. La répartition des souches porteuses des gènes de virulence en fonction des marchés était : Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) et Tilène (1/9). Les souches en provenance des SVPA ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. Parmi les souches porteuses de gènes de virulence recherchés, les souches STEC (*stx2*, *stx1-stx2*) étaient majoritaires 5/9 (77%). Deux souches isolées aux marchés de Fass et Gueule Tapée portaient à la fois les gènes *stx1* et *stx2* (Tableau XIII).

**Tableau 4. Prévalence de *E. coli* porteuse de gènes associés aux EHEC en fonction de l'origine des prélèvements**

Site	Nombre de souches testées	Prévalence de <i>E. coli</i> porteuse de gènes associés aux EHEC			
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1-stx2</i>
<b>SVPA</b>	13	0	0	0	0
<b>Sandaga</b>	33	0	3	1	0
<b>Tilène</b>	39	0	1	0	0
<b>Gueul tapé</b>	26	0	2	0	1
<b>Fass</b>	20	0	0	0	1
<b>Castor</b>	4	0	0	0	0
<b>Total</b>	135	0	6	1	2

### IV. Conclusion

Les résultats de dénombrement des *E. coli* ne sont pas un bon indicateur la présence de *Escherichia coli* pathogènes mais ils permettent d'évaluer les pratiques de l'établissement. Notre étude montre des

taux de contamination plus élevés au niveau des marchés que sur les échantillons prélevés par les SVPA au cours du débarquement des containers. Ce résultat montre l'apport important de contamination au niveau des circuits de distribution du à l'absence de chaîne de froid entre les grossistes et les détaillants dans les marchés.

Les facteurs de virulence des souches de *E. coli* sont couramment utilisés pour classer les isolats et déterminer leurs types d'associations, la pathogénicité et l'épidémiologie. Les souches en provenance des SVPA et du marché de Castor ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. La prévalence du gène *stx2* (3,7%) était plus élevée parmi les souches testées. Le variant Stx2 pose un véritable problème de santé publique. Les gènes codant Stx2 sont plus souvent retrouvés dans les isolats cliniques de patients développant des pathologies graves par rapport à ceux codant Stx1 et ses variants. Mais la présence de ces gènes n'est pas toujours synonyme d'infection dans la population.

Ainsi, la prévention du danger pour l'homme représentées par ces pathogènes reposent donc sur une sensibilisation des acteurs. Les opérateurs de viandes doivent observer le respect strict des bonnes pratiques d'hygiène avec limitation des contaminations fécales au cours de l'abattage (dépeçage et éviscération des animaux de boucherie). La manipulation de la viande de buffle congelée, leur conditionnement et leur transformation sont des pré-requis essentiels. Les bouchers doivent être sensibilisés et formés aux enjeux de santé publique pour le changement de pratiques.

## V. Bibliographie

**China, B., V. Pirson, and J. G. Mainil.** 1996. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3462-5.

**Crump, J. A., A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M. Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, P. M. Griffin, and T. J. Van Gilder.** 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* **347**:555-60.

**Grant, J., A. M. Wendelboe, A. Wendel, B. Jepson, P. Torres, C. Smelser, and R. T. Rolfs.** 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* **14**:1633-6.

**Hayashi T1, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H.** 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 2001 **8**(2):96.

**Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson.** 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* **1**:76.

**Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior.** 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **151**:775-82.

**O'Brien, A. O., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**:702.

**Vail, J. H., R. Morgan, C. R. Merino, F. Gonzales, R. Miller, and J. L. Ram.** 2003. Enumeration of waterborne *Escherichia coli* with petrifilm plates: comparison to standard methods. *J Environ Qual* **32**:368-73.