

6.2. Diagnostic des autres pathovars d'*E. coli*

Ils n'ont pas d'exigences métaboliques particulières. On les obtient presque en culture pure à partir des selles, surtout au tout début de la maladie. Cela n'est pas le cas pour les ECEI.

Les techniques de recherche de ces bactéries sont variées : les épreuves sur l'animal, les techniques immunologiques, le micro titrage, les cultures cellulaires, l'hybridation moléculaire ou l'amplification génique.

L'agglutination sur lame de verre ou en tube de colonies suspectes par des sérums spécifiques d'Ag O permet l'identification des ECEP. C'est une technique largement pratiquée par les laboratoires d'analyses biologiques en raison de sa simplicité.

Le modèle de l'anse d'intestin de lapin ligaturée a permis d'étudier le pouvoir entérotoxique des ECET, ECEH, ECEI et ECEAgg de phénotype agrégant. Ces épreuves empiriques sont des recours possibles.

Pour la culture cellulaire, 4 lignées cellulaires présentent un intérêt : cellules Y1 de surrénales de souris, cellules Vero de rein de singe vert africain, cellules épithéliales humaines de carcinome du côlon T84, cellules HeLa de carcinome utérin et Hep-2 de carcinome de larynx. La culture cellulaire permet de confirmer l'activité cytotonique ou cytotoxique des souches, de révéler les activités biologiques des nouvelles toxines (Cyto necrotic factor : CNF, Cyto distending toxin : CDT), d'identifier les phénotypes d'adhésion et d'invasion et les modifications du cytosquelette et de dépister de nouveaux pathovars sur la base d'observation d'effets cytopathiques nouveaux (Cyto distending *E. coli* : CDEC).

Les tests de biologie moléculaire détectent les gènes de pathogénicité tels : gènes *Stx*, gènes de la beta-glucuronidase, gènes d'attachement et d'effacement (*eaeA*) et d'adhérence agrégatives (*aaf/T*), gènes *bfpA* codant le "bundle forming

pili" etc. Les usuels sont le ribotypage et l'électrophorèse en champ pulsé avec restriction *Xba*I.

7. Eléments de thérapeutique

La base de la prise en charge est la réhydratation du malade ; l'antibiothérapie étant parfois plus nocive que bénéfique.

7.1. Traitement curatif

Le traitement des infections à ECEH est avant tout symptomatique (réhydratation, transfusion et/ou dialyse). L'administration de ralentisseurs de transit et/ou d'antibiotiques est controversée [34]. A l'heure actuelle sont entrain d'être développés des produits à base d'anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines Stx 1 et Stx 2.

Pour les autres pathovars, la diarrhée ne requiert qu'un traitement symptomatique pour prévenir ou corriger la déshydratation, le plus souvent par voie orale. Les anti diarrhéiques à base de ralentisseurs du transit intestinal peuvent être utilisés chez l'adulte mais ne sont pas recommandés chez l'enfant. L'antibiothérapie ne s'impose que si les symptômes persistent au-delà de 5 jours ou pour préserver la disponibilité professionnelle du malade.

7.2. Prévention

❖ Mesures générales

La prophylaxie repose avant tout sur le respect des règles fondamentales de l'hygiène et, dans les PED, en plus sur l'amélioration des conditions de vie.

Des recherches sont en cours pour une prophylaxie vaccinale contre des *E coli* agents d'entérites, notamment les ECET et les ECEP.

❖ Mesures contre ECEH

Il n'existe aucune prophylaxie spécifique en dehors des recommandations habituelles de prévention des infections à dissémination fécale [1]. Lors de la manipulation de denrées alimentaires, il faut :

- Se laver les mains au savon après être allé aux toilettes, avant de cuisiner et chaque fois que l'on a touché de la viande crue ;
- Laver et éplucher les légumes et les fruits avant de les consommer;
- Bien cuire la viande hachée ;
- Ne pas apprêter d'aliments lorsque l'on souffre de diarrhée ;
- Faire bouillir le lait cru ;
- Stocker et apprêter la viande crue séparément, lors de grillades en particulier (utiliser différentes planches, assiettes, pinces) ;
- Laver et sécher immédiatement et soigneusement les surfaces et objets ayant été en contact avec de la viande crue, des emballages ou de l'eau de dégel (idéalement avec un chiffon à usage unique) ;
- Changer les chiffons et les essuie-mains après avoir apprêté de la viande crue ; les laver à 60°C au minimum.

En cas de flambée d'infections à ECEH, la rapidité de la réaction est cruciale pour la réussite de l'enquête, ce qui présuppose notamment que celui ou celle qui soupçonne une flambée, informe immédiatement les autorités de santé.

Des recommandations particulières ont été édictées pour les producteurs de graines germées qui sont devenues ces dernières années, très populaires dans les pays développés en raison de leur valeur nutritionnelle. L'investigation des flambées a montré que les agents pathogènes trouvés dans les graines germées viennent très probablement des graines elles-mêmes qui auraient été contaminées dans les champs ou au cours de la récolte, de la conservation ou du transport [35].

DEUXIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE

1. Cadre et Période de l'étude

1.1. Cadre de l'étude

❖ Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar

L'Hôpital d'Enfants Albert Royer (HEAR) est un établissement universitaire. Sa capacité d'accueil est de 124 lits. Il comporte :

- Services d'hospitalisation : Pavillon K (Soins Intensifs), Pavillon N (Néonatalogie), Pavillon M (Nourrissons), Pavillon O (Grands enfants) et Chirurgie pédiatrique ;
- Services des soins externes : Consultation externe, Hématologie clinique, Dermatologie, Odontologie, Ophtalmologie, Neurologie ;
- Services techniques : Laboratoire d'analyses médicales, Radiologie

La recherche des souches d'*E. coli* O157:H7 a été réalisée dans l'Unité de Bactériologie-Virologie du Laboratoire de l'HEAR.

❖ Points de collecte des échantillons de produits carnés

Nous avons travaillé au niveau des structures suivantes :

- SOGAS (Société de Gestion des Abattoirs du Sénégal) anciennement appelée la SERAS (Société d'Exploitation des Ressources Animales du Sénégal) ; cet abattoir national situé à environ 9 Km de Dakar est géré par un Docteur vétérinaire qui est chargé de contrôler l'état de santé des animaux avant l'abattage et ensuite la qualité de la viande. La SOGAS dispose d'un Laboratoire de contrôle des denrées alimentaires situé dans l'enceinte même de l'établissement. Etant dans un pays islamique, l'abattage des animaux se fait selon le rituel musulman, c'est-à-dire que l'animal est égorgé puis débarrassé de sa tête et de ses pattes avant d'être suspendu à des crochets et d'être débarrassé de sa peau et de sa queue. Ensuite il est éventré pour être dépecé et après on le scinde en deux parties. Enfin l'animal arrive chez le boucher pour un dernier contrôle avant d'être amené à la chambre froide. Le nettoyage des viscères se fait dans une autre salle contigüe à celle du dépeçage.

- Marchés (2) et Super marchés (1).

1.2. Période de l'étude

La collecte des échantillons a été faite sur une période allant de novembre 2010 à juin 2012. Les échantillons de selles ont été recueillis durant cette période ; ceux des produits carnés de mai au 16 juin 2012.

2. Matériel et Méthodes de l'étude

2.1. Matériel de l'étude

2.1.1. Echantillons de l'étude

❖ Echantillons de selles

Nous avons travaillé sur les échantillons de selles reçus au Laboratoire de l'HEAR pour coproculture. Ils ont été collectés chez des enfants hospitalisés ou non et chez des adultes venus en consultation. En définitive, nous avons recherché *E. coli* O157 dans 1677 échantillons de selles. Un seul échantillon a été comptabilisé par patient, les coprocultures de contrôle n'ont pas été prises en compte.

Tableau I : Répartition des échantillons de selles selon les patients

Patients	Adultes	Enfants	Total
Masculin	81	913	994
Féminin	106	577	683
Total	187	1490	1677

❖ Echantillons de produits carnés

Cent dix (110) échantillons de viandes ou d'intestins dont 43 de bœuf, 34 de porc et 33 de mouton ont été collectés. A la SOGAS ainsi que dans les marchés, nous avons prélevé des fragments de muscle et d'intestins. Un seul type d'échantillon a été collecté par animal (viande ou intestins) [Tableau II, Photo 1].

Tableau II : Répartition des échantillons de viande selon les sites de collecte

Echantillons de viande			Sites de collecte des échantillons		
Nature		Nombre	SOGAS	Supermarché	Marché
Boeuf	Viande	23	20	1	2
	Intestin	20	20	0	0
Mouton	Viande	15	15	0	0
	Intestin	18	15	0	3
Porc	Viande	19	15	0	4
	Intestin	15	15	0	0
Total		110	100	1	9

Légende : SOGAS = Société de Gestion des Abattoirs du Sénégal



Photo 1 : Echantillons d'intestins conditionnés en rouleaux [personnelle]

2.1.2. Matériel de l'étude

❖ Matériel de recueil des échantillons

Les selles ont été recueillies dans des pots stériles ayant une cuillère fixée sur leur couvercle.

Les échantillons de viande ont été collectés dans des sachets stériles en plastique. Les fragments de viande ont été prélevés avec le couteau du boucher du site concerné. Les échantillons d'intestin ont été soit prélevés avec le couteau ou alors achetés déjà conditionnés en « rouleaux ».

❖ Matériel d'appoint pour le recueil des échantillons

- Abaisse-langues stériles
- Gants stériles en latex à usage unique
- Balance électronique de précision
- Entonnoir en verre, compresses stériles
- Sachets en plastiques stériles de capacité 1L
- Mortiers + pilons en porcelaine stériles
- Sable de mer lavé et stérilisé pendant 20 minutes à 130°C
- Matériels de base dans un laboratoire de Bactériologie

❖ Milieux de culture

- Milieu d'enrichissement : le bouillon trypticase soja a été utilisé. Il favorise la croissance bactérienne.
- Milieu d'isolement : la gélose Mac-Conkey au sorbitol (SMAC) a été ensemencée. C'est un milieu sélectif contenant du sorbitol, sucre non fermenté par *E. coli* O157:H7.
- Milieux d'identification : il s'agit de la gélose Mueller-Hinton (MH), de la gélose de Kligler-Hajna et de la gélose au Citrate de Simmons. Les bouillons utilisés sont : le bouillon urée indole, la solution saline de chlorure de sodium (NaCl à 9%).
- Gélose MH pour la réalisation de l'antibiogramme

❖ Réactifs

- Carte de réaction *E. coli* O157 Dryspot (Laboratoire OXOID) comportant :
 - Carte de réaction portant les particules de latex bleues sensibilisées avec les anticorps anti *E. coli* O157
 - Bande portant l'extrait antigénique d'*E. coli* O116 inactivé et coloré en vert représentant le contrôle négatif
 - Bande portant l'extrait antigénique d'*E. coli* O157 inactivé et coloré en rose représentant le contrôle positif.
- Kit Color Gram de Bio Mérieux : il sert pour la coloration de Gram
- Disques d'antibiotiques pour les tests de sensibilité

2.2. Méthodes de l'étude

2.2.1. Collecte des échantillons

La méthodologie varie selon qu'il s'agit des selles ou de la viande.

❖ Recueil des échantillons de selles

Environ 10 grammes de selles fraîchement émises étaient recueillis à l'aide de la cuillère fixée sur le couvercle du pot de prélèvement. Le prélèvement pour les enfants hospitalisés a été fait par le personnel paramédical et par les parents pour les enfants non hospitalisés. Sur les instructions du personnel paramédical, les adultes effectuaient eux même leur prélèvement. L'échantillon collecté était acheminé immédiatement au laboratoire en vue de son analyse sans délai de conservation. Tous les échantillons étaient systématiquement étiquetés.

❖ Recueil des échantillons de viande

Sur le terrain, nous avons prélevé 50 à 100 grammes de viande fraîche et/ou d'intestins par carcasse d'animal. Les échantillons ont été placés dans des sachets stériles et conservés à +4°C dans une glacière. Le temps de leur acheminement au laboratoire de l'HEAR n'excédait pas 2 heures.

2.2.2. Technologie au Laboratoire

Après étiquetage, les échantillons étaient enregistrés. Alors seulement la recherche d'*E. coli* O157:H7 pouvait débiter.

2.2.2.1. Coproculture classique

Nous avons pratiqué une coproculture classique. Mais seule la procédure de recherche d'*E. coli* O157:H7 sera détaillée. Elle s'est déroulée sur 4 jours :

❖ Premier jour

Après examen macroscopique des selles, on recherche au microscope optique des leucocytes, des hématies et des parasites.

Ensuite une goutte de selles (diluées au besoin) est déposée sur une gélose Mac-Conkey Sorbitol (SMAC). L'ensemencement se fait selon la méthode des quadrants. La gélose SMAC est incubée durant 24H à +37°C, en aérobiose.

❖ Deuxième jour

Les colonies suspectées d'être celles d'un *E. coli* O157:H7 sont repérées sur la gélose SMAC : elles sont incolores et transparentes (elles ne fermentent pas le sorbitol) ; les bactéries fermentant ce sucre donnent des colonies roses.

Cinq colonies suspectes sont repiquées chacune sur une mini galerie comprenant une gélose Kligler-Hajna (KH), une gélose au Citrate de Simmons (CS) et un bouillon urée-indole (UI). Cette mini galerie est incubée à +37°C, pendant 24H, en aérobiose.

❖ Troisième jour

L'identification présomptive à partir de la mini galerie consiste à rechercher les caractères orientant vers l'espèce *E. coli*. Il s'agit de : bacille à Gram (-), fermentation du lactose et du glucose avec production de gaz, absence de croissance sur gélose au CS, uréase (-) et indole (+).

On procède alors à la confirmation du diagnostic d'*E. coli* O157:H7 par agglutination de la souche avec les réactifs du Kit *E. coli* O157 Dryspot (OXOID).

Une fois le diagnostic confirmé, on réalise un antibiogramme (ABG) standard selon la méthode de diffusion de l'antibiotique en gélose (gélose MH). En résumé, cinq colonies sorbitol (-) bien individualisées sont ensemencées dans

2ml de bouillon cœur cerveau que l'on incube pendant 3H à +37°C ; la densité de l'inoculum est ajustée à celle d'un étalon Mac Farland 0,5 puis il est étalé à l'aide d'un écouvillon sur la gélose MH (l'épaisseur de la gélose sera de 4 mm dans une boîte de Pétri ronde de 90 mm de diamètre) ; après le dépôt des disques d'antibiotiques choisis, le milieu est incubé à +37°C pendant 24H.

Les souches suspectes n'ayant pas agglutiné avec les anticorps anti *E. coli* O157 ont été conservées à -40°C en vue de leur typage ultérieur par un laboratoire disposant des anticorps dirigés contre les autres sérotypes du pathovar ECEH.

❖ Quatrième jour

Les résultats de l'ABG sont lus comme suit : on mesure les diamètres d'inhibition autour de chaque disque d'antibiotique et on rend les résultats en souche « sensible » ou « résistante » selon les indications fournies par le fabricant du disque d'antibiotique.

Nota Bene : lors de la coproculture classique, nous avonsensemencé également les géloses Hektoen et Thiosulfate Citrate Bile Saccharose, les bouillons Mueller Kauffmann et l'eau peptonée alcaline pour la recherche de *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrio*. Pour rechercher *Campylobacter jejuni* nous avonsensemencé une gélose Campy (gélose MH + sang frais de cheval + antibiotiques) et pour la recherche des Rotavirus et des Adénovirus, nous avons utilisé des tests d'agglutination au latex.

2.2.2.2. Culture des échantillons de viande

❖ Pré-test

Il nous a permis de cerner les difficultés inhérentes à la collecte et à l'analyse des échantillons de viande. Trois échantillons de viande achetés dans une alimentation ont été traités au laboratoire selon la procédure ci-dessous :

❖ Premier jour

Cinquante grammes (50 g) de produit carné sont découpés finement, puis broyés manuellement dans un mortier en porcelaine, en présence de sable de mer stérile et d'eau isotonique. Le liquide de broyage est filtré à l'aide de compresses stériles et recueilli dans un flacon stérile.

Une goutte du filtrat est ensemencée sur gélose SMAC (1^{ère} gélose) selon la technique des quadrants ; on l'incube pendant 24H à +37°C, en aérobiose.

Parallèlement, trois gouttes du filtrat sont ensemencées dans 5ml de bouillon trypticase soja en vue d'un enrichissement. Après 8H d'incubation à +37°C, une goutte de bouillon est repiquée sur une gélose SMAC neuve (2^{ème} gélose SMAC) qui est incubée dans les mêmes conditions que la 1^{ère} gélose.

❖ Deuxième jour

Cinq colonies incolores (sorbitol négative) sont repérées sur chacune des 2 géloses SMAC. Chaque colonie est repiquée sur mini galerie (KH, CS, UI) qui est incubée à +37°C en aérobiose pendant 24H.

❖ Troisième jour

L'identification présomptive (caractères bactériologiques) et la confirmation (agglutination) sont faites selon la procédure décrite dans le chapitre « Coproculture ». On pratique ensuite un ABG standard.

❖ Quatrième jour

L'ABG standard réalisé le 3^{ème} jour sur les isolats identifiés est lu selon les normes ci-dessus indiquées dans le chapitre « Coproculture ».

2.2.2.3. Test d'agglutination d'*E. coli* O157

❖ Principe du test

Des particules de latex sensibilisées avec un anti sérum *E. coli* O157 sont mises en présence des corps bactériens contenus dans les colonies suspectes. En cas de positivité, les particules de latex agglutinent entre elles.

Le kit contient une carte de réaction sur laquelle se trouvent trois zones tests et trois zones de contrôles permettant de réaliser trois tests d'agglutination sur chaque carte de réaction ; deux bandes témoins : l'une (Contrôle négatif) contient des particules de latex sensibilisées avec l'extrait d'antigène d'*E. coli* O116 inactivé et l'autre bande (Contrôle positif) renferme des particules de latex sensibilisées avec l'extrait d'antigène spécifique d'*E. coli* O157 inactivé.

❖ Mode opératoire du test

On ajoute une goutte (50µl) de solution saline sur la carte de réaction dans chacune des deux zones (zone « test », zone « contrôle »).

Ensuite, à l'aide d'une ose stérile on prélève une partie (le 1/3 environ) de la colonie suspecte que l'on mélange à la solution saline sur la zone « test » de la carte jusqu'à obtenir une suspension homogène que l'on étale sur toute la zone. A l'aide d'une autre ose, on mélange une autre partie de la colonie suspecte à 50 µl de solution saline dans la zone « contrôle » jusqu'à homogénéisation complète de façon à recouvrir toute la zone de contrôle.

Enfin on imprime des mouvements de rotation douce à la carte pendant 1 minute. On recherche une agglutination (réaction positive) dans la zone « test » ; cela signe la présence d'*E. coli* O157 dans la colonie suspecte testée [Photo 2].

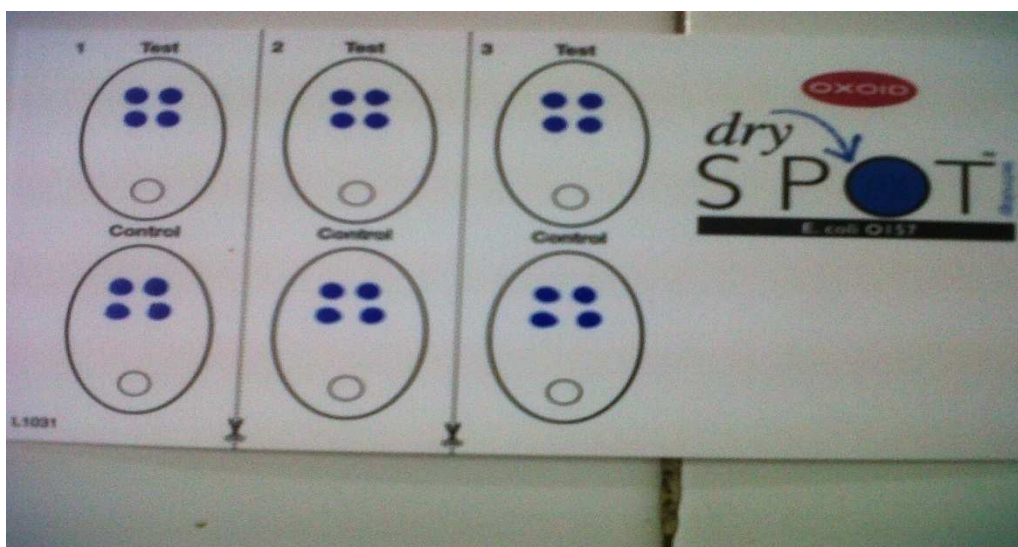


Photo 2 : Carte de réaction *E. coli* O157 Dryspot (OXOID) [Personnelle]