

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

REPUBLIQUE DU MALI



Un Peuple – Un But – Une Foi



UNIVERSITE DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Année Universitaire 2005 – 2006

Thèse N° _____/P

**EVALUATION DU ROLE DE SAMONELLA TYPHI ET PARATYPHI A, B, C
DANS LES INFECTIONS BACTERIENNES INVASIVES EN MILIEU
PEDIATRIQUE À PARTIR DES LIQUIDES BIOLOGIQUES EXAMINES AU
LABORATOIRE CVD DE L'HOPITAL GABRIEL TOURE**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le ___ / ___ / 2006

Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par Mr DIABATE Cheick Fanta Mady

Pour obtenir le Grade de

Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Professeur Amadou DIALLO

Membre : Professeur Samba Ousmane SOW

Codirecteur de thèse : Docteur Souleymane DIALLO

Directeur de thèse : Professeur Flabou BOUGOUDOGO

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2005 – 2006

LISTE DU PERSONNEL

ADMINISTRATION :

Doyen : Anatole TOUNKARA - Professeur
1^{er} Assesseur : Drissa DIALLO - Maître de conférences agrégé
2^{ème} Assesseur : Sékou SIDIBE - Maître de conférences agrégé
Secrétaire Principal : YENIMEGUE Albert DEMBELE - Maître de conférences agrégé
Agent Comptable : Mme COULIBALY Fatoumata TALL - Contrôleur des Finances

LES PROFESSEURS HONORAIRES :

Mr Alou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie -Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo – phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE	Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro - Entérologie

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D E R & PAR GRADE :

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALISTES CHIRURGICALES :

1. PROFESSEURS :

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie- Réanimation

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco – Obstétrique

3. MAITRES DE CONFERENCES :

Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie – Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie

4. MAITRES ASSISTANTS :

Mme DIALLO Fatimata S DIABATE	Gynéco – Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale et Thoracique
Mr Issa DIARRA	Gynéco – Obstétrique
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie – Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE :

Mme Diéneba DOUMBIA	Anesthésie/ Réanimation
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Adama SANGARE	Orthopédie – Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophthalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophthalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie – Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophthalmologie
Mr Mady MAKALOU	Orthopédie – Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie
Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie – Obstétrique
Mr Tiemoko D COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL

D.E.R DE SCIENCES FONDAMENTALES :

1. PROFESSEURS :

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Siné BAYO	Anatomie–Pathologie – Histo - embryologie
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie – Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakary M CISSE	Biochimie
Mr Abdourahamane S MAIGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :

Mr Amadou TOURE	Histo - embryologie
Mr Flabou BOUGOUDOU	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie

3. MAITRES DE CONFERENCES :

Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAIGA	Bactériologie – Virologie

4. MAITRES ASSISTANTS :

Mr Abdourahamane TOUNKARA	Biochimie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie – Virologie
Mr Cheik Bougadari TRAORE	Anatomie – Pathologie
Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie

5. ASSISTANTS :

Mr Mangara M BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie
Mr Bokary Y SACKO	Biochimie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES :

1. PROFESSEURS :

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de D.E.R
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y MAIGA	Gastro – entérologie – Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato – Léprologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo – Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne

3. MAITRES DE CONFERENCES :

Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro – entérologie

4. MAITRES ASSISTANTS :

Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Daouda K. MINTA	Maladies Infectieuses

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE :

Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme DIARRA Assétou SOUCKO	Médecine Interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies Infectieuses
Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie

D.E.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES :

1. PROFESSEURS :

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique, Chef de D.E.R.

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Mr Drissa DIALLO	Matières Médicales

3. MAITRES DE CONFERENCES :

Mr Boukassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie
Mr Alou KEITA	Galénique

4. MAITRES ASSISTANTS :

Mr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Ababacar I MAIGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie

5. ASSISTANTS :

Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

D.E.R DE SANTE PUBLIQUE :

1. PROFESSEURS :

Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique, Chef de D.E.R.
Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE :

Mr Moussa A MAIGA	Santé Publique
-------------------	----------------

3. MAITRES ASSISTANTS :

Mr Bocar G TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A DICKO	Santé Publique

4. ASSISTANTS :

Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Bio-statistique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES :

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Lassine SIDIBE	Chimie Organique

ENSEIGNANTS EN MISSION :

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie

DEDICACES

DEDICACES

A mon père Fodé Kaba Diabaté

Très cher père, voici le fruit de la belle éducation que tu as eu à nous procurer. Tous tes enfants à travers ma voix sont très fiers de toi. Ta rigueur et ton honnêteté nous ont toujours été un exemple à suivre. Tu as su nous montrer les règles de bonnes conduites et tu t'es sacrement battu pour que nous puissions réussir. Voici enfin le résultat de tes nombreuses prières et de tes multiples sacrifices. Tes encouragements et tes bénédictions ne m'ont jamais fait défaut. Ce travail est le témoignage de toute mon affection et de mon profond respect envers toi. Que le tout Puissant te garde aussi longtemps parmi nous. Amen !

A ma mère Konaté Assétou

Très chère mère, je ne cesserai jamais de te remercier pour ta sagesse, ton honnêteté et ta grande générosité. Ce travail est le fruit de ton encouragement et de tes nombreuses bénédictions. Ton dévouement et ton soutien efficace de tous les jours nous ont permis d'atteindre notre objectif. Puisse ce modeste travail te donner un début de satisfaction de tes vœux les plus sincères.

Que Dieu nous prête une longue vie pour que tu puisses partager avec nous le fruit de ce travail.

A ma tante Keïta Djélikan

Très chère tante, je ne cesserai jamais de te remercier pour ta sagesse, ton honnêteté et ta grande générosité. Ce travail est également le fruit de ton encouragement et de tes nombreuses bénédictions. Puisse ce modeste travail te donner un début de satisfaction de tes vœux les plus sincères.

Que Dieu te donne une longue vie pour partager ce grand bonheur avec nous.

A mes soeurs : Kadiatou Diabaté, Adia, Dokomani, Fatoumata et Soguè Diabaté

Très chères sœurs, je ne saurais oublier ce lien d'amitié de fraternité et de grande complicité qui nous unies. C'est vous qui m'avez toujours montré le chemin de l'excellence. Le fait de vous avoir comme sœurs a été une source d'inspiration pour moi et je considère cela comme une chance énorme. Vos soutiens inconditionnels et vos soucis de bien faire, m'ont accompagné tout au long de ce travail. Que Dieu consolide cette cohésion entre nous.

A mon frère cadet Amara Diabaté

Mon cher frère, je te dis beaucoup de courage car le chemin à parcourir est très difficile et plein d'obstacle. Je peux te rassurer que je serai toujours là pour toi. Je te souhaite plein de succès dans tout ce que tu entreprends. Je suis fier de toi et que l'esprit de cohésion nous anime toujours.

A mon homonyme Feu Chérif Cheick Fanta Mady Haïdara dit kankan Sékouba

Vos bénédictions ne m'ont jamais fait défaut. Trouvez ici l'expression de mes meilleurs souvenirs et de ma reconnaissance à votre égard.

Que la terre vous soit légère. Que votre âme repose en paix.

Amen !

A mes grands parents

Feu Famoro Diabaté ; feu Djégnouma Kouyaté dite Gna ; Nakan dite Mah ; Feu Feu Djémoussa Diabaté ; Kéla Balla Diabaté; Yamoudou Diabaté ; Feu Moussa Diabaté.

Vous avez toujours fait preuve de bonne volonté et d'une grande affection dont un petit- fils peut vouloir. Vos bénédictions ne m'ont jamais fait défaut. Trouvez ici l'expression de mes meilleurs souvenirs et de ma reconnaissance à votre égard.

Que la terre leur soit légère pour ceux qui ne sont plus parmi nous. Que leur âme repose en paix. Amen !

A mes cousins et cousines

Sitan, Mamou, Fanta, Mariam, Ya, Aminata, Adia, Tènè, Batomafitini, Bagninifitini, Djouldé Bah, Ibrahim Bah, Dadourou Bah, Ali Bah, Amadou Bah, Boubacar Bah, Foutoumata Bah, Limata Sawadogo, Mohamed Bah...

Vous qui m'avez toujours supporté et soutenu, sachez que ce travail est également le vôtre et veuillez recevoir toute ma reconnaissance.

A mes neveux et nièces

Cheick Oumar Diabaté, Assi Sangaré...

Je vous souhaite beaucoup de courage et de succès, surtout que Dieu vous garde en bonne santé et vous donne une longue vie.

Aux orphelins et aux victimes de l'injustice du monde entier

La vie n'est certes pas facile mais soyez courageux pour affronter tous les obstacles qui vous accablent. Ce travail est également le vôtre.

A tous les enfants malades du monde entier

Que le Miséricordieux vous donne la santé. Amen !

Diabaté Cheick Fanta Diabaté

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

A Allah le Tout Puissant et son Prophète Mohamed (paix et salut sur lui).

Aux familles

Diabaté à Djikoroni, à lafiabougou, à Bamako- coura, à Bougouni, à Kéla, en Cote d'ivoire et en Guinée Conakry, Bah à Magnambougou, Traoré à Hamdallaye, Traoté à Sogoniko, Kamissoko à Hamdallaye, Keïta à Djoliba

Merci pour vos conseils et vos soutiens matériels et moraux.

A mes tontons

Almamy Diabaté, Lamine Diabaté, Bandia Diabaté, Kéla Balla Diabaté, Yamoudou Diabaté, Oumar Traoré, Tièkoroba Traoré, Alou Traoré, Feu Baya Traoré, Dan Traoré.

Merci pour vos encouragements.

A mes tantes

Sarandjan Diabaté, Bintou Diabaté, Oumou Diabaté, Djéssira Diabaté, Bougoumba Diabaté, Mme Traoré Rokia Simpara, Sadio, Mamou, Tchini, Any, Batoma, Oumou, Oumou Keïta, Kamissa Keïta, Aïssata Keïta, Doussouba Keïta.

Merci pour vos encouragements.

A mes camarades de promotion de la FMPOS

Ensemble on a su regrouper nos forces afin de s'aider mutuellement pour franchir les différents obstacles de vie estudiantine.

Je vous dis encore Merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées.

A mes amis les plus chers

Abdoul Wahab Sow, Warren dit Tiemoko Kanté, Modibo Sadessi, Amadoun Aphady Cissé, Lamine Labasse Keita, Cheick Diallo, Makandian Dembélé, .Christ Seydou Sangaré, Dramane Berthé, Bakary Coulibaly, Moussa Diallo, Amadou Bah, Ibrahim Dembele, Aoua Djibrila Touré, Ramatoulaye N'Diaye.

Comme on a l'habitude de le dire : « C'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses vrais amis », moi je vous ai reconnu car vous étiez toujours là pour me soutenir dans les moments durs. Sachez qu'en aucun instant je n'ai regretté votre compagnie. Merci pour votre affection et pour votre sincère fidélité.

Que Dieu renforce d'avantage ce lien si sacré qui nous unit.

A mes camarades de promotion de la FMPOS

Kadi, Mamou, Antoine Dara, Seydou, Mohamed Tounkara, Ali Adou Diallo, Ladji Dembélé, Joel, Nasser, et tous ceux qui n'ont pas été nommés ici.

Ensemble on a su regrouper nos forces afin de s'aider mutuellement pour franchir les différents obstacles de vie estudiantine.

Je vous dis encore Merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées.

Au personnel de CVD

A l'équipe du CVD-Baltimore

A Myron M. Levine, M.D., DTPH
Professeur et Directeur de CVD
mlevine@medicine.umaryland.edu
Health Sciences Facility I, Room 480
Phone: 410-706-7588 (Office)
Fax: 410-706-6205
LAB: N/A



A Milagritos D. Tapia, M.D.
Assistant Professeur de Pédiatrie
mtapia@medicine.umaryland.edu
Health Sciences Facility I, Room 480
Phone: 410-706-5328 (Office)
Fax: 410-706-6205
LAB: N/A



A Karen L. Kotloff, M.D.
Professeur de Pédiatrie
kkotloff@medicine.umaryland.edu
Health Science Facility, Room 480
Phone: 410-706-5328 (Office)
Fax: 410-706-6205
LAB: N/A



Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

A Rosangela Mezghani, Ph.D.

Instructeur
mezghan@medicine.umaryland.edu
Health Sciences Facility I, Room 480
Phone: 410-706-5328 (Office)
Fax: 410-706-6205
LAB: N/A



A Marcelo B. Sztein, M.D.

Professeur de Pédiatrie, Médecine, Microbiologie et
Immunologie
msztein@medicine.umaryland.edu
Health Sciences Facility I, Room 480
Phone: 410-706-5328 (Office)
Fax: 410-706-6205
LAB: N/A



Nous avons vite apprécié votre qualité humaine et scientifique malgré la distance qui nous sépare.

Votre souci pour la recherche et pour l'obtention des résultats fiables.

Votre esprit de créativité et de disponibilité nous a beaucoup touché.

Votre rigueur scientifique fait de vous des chercheurs aux multiples qualités inestimables.

Mes sincères remerciements.

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

A tous les médecins, techniciens et agents de terrain de CVD Mali.

Vous n'avez ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail

A mes aînés du laboratoire d'Analyses Médicales

Drs Aliou Touré, Mariam Samaké, **Tenin Samaké**, Nia Kadidia Samaké ;

Vous avez tous contribué à la belle réalisation de ce travail et merci sincèrement pour tout.

Au professeur Samba O. Sow, MD, MSc coordinateur CVD- Mali et tout le personnel du CVD

Merci pour l'expérience acquise auprès de vous.

Au personnel de l'hôpital Gabriel TOURE, plus particulièrement tout le personnel du laboratoire d'Analyses Médicales

Merci pour votre collaboration, votre contribution, et pour esprit d'équipe.

A tout le corps professoral de la FMPOS

Je vous témoigne toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour l'enseignement et les encadrements reçus.

A tous mes enseignants depuis le primaire

Vous avez toutes mes considérations et je vous suis parfaitement reconnaissant pour toute la formation que vous m'avez donnée. Merci pour tout.

A tous les étudiants de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Merci pour les nombreux souvenirs des années passées ensemble.

A toutes les personnes de bonne volonté de près ou de loin qui ont contribué à la bonne réussite de ce travail.

Qu'elles en soient remerciées.

AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury

Professeur Amadou DIALLO

Professeur de Zoologie et de Biologie Animale

Chef de DER des Sciences Fondamentales à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS)

Vice Recteur de l'Université du Mali

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Votre simplicité, votre modestie et votre rigueur dans la recherche scientifique font de vous un homme respecté et admirable. Depuis le moment où on a franchi le seuil de cette Faculté, nous avons été vite impressionnés par votre dévouement et votre sens élevé de la personnalité humaine. Votre disponibilité, votre passion dans le travail et vos grandes qualités d'homme de science, de chercheur font de vous une référence.

Cher Maître, veuillez accepter l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

A notre Maître et juge

Professeur Samba Ousmane SOW

Spécialiste en Léprologie, Epidémiologiste des pathologies infectieuses

Chef de l'Unité Léprologie du CNAM

Coordinateur du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD- Mali)

Cher Maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury de thèse malgré vos immenses occupations.

Votre souci du travail bien fait, vos qualités professionnelles et humaines font de vous un maître estimé et admiré de tous.

Votre courtoisie et votre esprit de collaboration ont beaucoup contribué à l'amélioration de ce travail.

Veillez, cher maître, accepter l'expression de nos sentiments de sincère reconnaissance et notre profond respect.

A notre Maître et Co- Directeur

Docteur Souleymane DIALLO

Pharmacien Biologiste des Services de Santé des Armées.

Maître assistant de Bactériologie- Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Chef de service du laboratoire d'Analyses Médicales de l'Hôpital Gabriel Touré

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots me manquent pour exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Je peux d'ailleurs affirmer que j'ai fait mes premières initiations dans le monde de la microbiologie à vos côtés. Votre simplicité, votre compétence et votre rigueur scientifique sont des atouts qui nous ont fasciné et dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la belle réalisation de ce travail qui, également, est le vôtre.

Cher Maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères reconnaissances.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

Maître de conférence agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique

Responsable des cours de bactériologie et virologie à la FMPOS

Cher Maître, vous nous aviez fait honneur en acceptant la réalisation de cette thèse dans le Service du laboratoire d'Analyses Médicales de L'Hôpital Gabriel TOURE. En plus de votre statut de chercheur confirmé et aguerri, nous avons vite apprécié vos immenses qualités humaines et scientifiques. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître respecté et admiré de tous.

Soyez assuré, cher maître, de notre sincère admiration et de notre profonde gratitude. Nous vous réitérons tous nos remerciements.

ABREVIATIONS ET SIGLES

ATCC : American Type Culture Collection

ADN : Acide Désoxyribonucléique

βGAL : Béta-Galactosidase

BGP : Bacille Gram Positif

BGN : Bacille Gram Négatif

CGPch : Cocci Gram Positif en Chaînette

CGPgr : Cocci Gram Positif en grappe

CGPpr : Cocci Gram Positif en paire

CIT : Citrate

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de Carbone

CoccoBGN : Cocco Bacille Gram Négatif

CVD : Centre pour les Vaccins en Développement

DCGN : Diplocoque Gram Négatif

S. Typhi : Salmonella Typhi

FRU : Fructose

GLU : Glucose

H₂S : Hydrogène Sulfureux

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

LCR : Liquide Cephalo-Rachdien

mg /L : Milligramme par Litre

mm : Milli- Mètre

µg : Micro- Gramme

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucleoside

NAD- P : Nicotinamide Adénine Dinucleoside- Phosphate

NCTC : National Collection of Type Culture

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : Ortho NitroPhenyl-BD-Galactopyranosydase

TMP- SMX : Trimetoprim Sulfaméthoxole

TSA : "Tripcase Soja Agar"

UI : Unité International

URE : Uréase

° C : Degré Celsius

% : Pourcent

≥ : Supérieur ou égal

PLAN

INTRODUCTION

Objectif général

Objectifs spécifiques

GENERALITES SUR LES SALMONELLA

Physiopathologie des salmonella

Caractères bactériologiques des Salmonella

METHODOLOGIE

Méthode

Etude

Protocole de technique de l'hémoculture

Protocole de technique du LCR et des autres liquides biologiques

RESULTATS

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

RESUME

ANNEXES

SOMMAIRE

SOMMAIRE

1. GENERALITES SUR LES SALMONELLA

1.1. Historique

1.2. Définition

1.3. Habitat

1.4. Physiopathologie

1.4.1. Pouvoir pathogène naturel

1.4.2. Pouvoir pathogène expérimental

1.4.3. Pathogénie

1.4.4. Aspect clinique

1.5. Caractères bactériologiques

1.5.1 Morphologie et colorabilité

1.5.2. Caractères cultureux et milieux de culture

1.5.3. Caractères biochimiques

1.5.4. Caractères antigéniques

1.5.4.1 Antigène de paroi ou antigène O

- Facteurs O majeurs

-Facteurs O accessoires

1.5.4.2. Antigène d'enveloppe

1.5.4.3. Antigène flagellaire ou antigène H

1.5.4.4. Identification du sérovar

- Détermination de facteur O majeur caractéristique

- Détermination de l'antigène H

- Variété antigénique du sérovar

1.6. Nomenclature

1.7. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1.7.1. Méthode directe

1.7.1.1. Sang pour hémoculture

1.7.1. 2. Selles pour coproculture

1.7.1. 3. LCR et autres prélèvements

1.7.1.2. Cultures

1.7.1.3. Isolement et identification

1.7.1.4. Sérogroupage

1.7.1.4.1. Principe

1.7.1.4.2. Cas spécifique de Salmonella Typhi

1.7.2. Méthode indirecte : Sérodiagnostic de FELIX et WIDAL

1.8. TRAITEMENT

1.9. Contrôle de l'infection

1.9.1. Epidémiologie

1.9.2. Prophylaxie

1.9.2.1. Mesures d'hygiène

1.9.2.2. Vaccination par le Typhim-Vi

2. METHODOLOGIE

2.1. Présentation de la méthode

2.2. Cadre de l'étude

2.3. Etude

2.3.1. Type d'étude

2.3.2. Durée de l'étude

2.3.3. Critères d'inclusion et de non inclusion

2.3.3.1. Critères d'inclusion

2.3.3.2. Critères de non inclusion

2.4. Protocole et méthode de travail du Liquide Céphalo –Rachidien et des autres liquides biologiques

2.4.1. Traitement des prélèvements LCR

2.4.1.1 Protocole de travail de la Culture du LCR

2.4.1.2 Résultat de la culture

2.4.2. Traitement des hémocultures positives et des autres liquides biologiques

2.4.2.1. Protocole de techniques des hémocultures positives

2.5. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

2.5.1. Coloration de GRAM

2.5.2. Tests biochimiques et métaboliques

2.5.2.1. Oxydase

2.5.2.1. Galeries classiques pour entérobactéries

2.5.2.2. Galerie API 20E

2.5.3. Tests d'agglutination

2.6. Tests de sensibilité aux antibiotiques

2.7. Conservation des cultures

2.8. Eléments de l'assurance qualité

3. Résultats

3.1. Fréquences des prélèvements

3.2. Germes identifiés à partir des prélèvements

3.2.1. Salmonella Typhi et formes apparentées isolés des prélèvements

3.2.2. Profil antibiotypique

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

4. Commentaires et discussion

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les fièvres typhoïde et paratyphoïde sont causées par *Salmonella Typhi* et *Paratyphi A, B et C*, qui contrairement à la plupart des autres espèces du genre *Salmonella*, n'affectent que les humains, chez qui elles causent une maladie systémique grave. Les germes sont généralement transmis par des aliments ou des boissons contaminées par les matières fécales des personnes atteintes de la maladie ou des porteurs asymptomatiques de *Salmonella Typhi*. Le taux de létalité de ces maladies varie de ¹ 16 % parmi les cas non traités à moins de 1% chez les personnes qui reçoivent une antibiothérapie appropriée. De 2% à 5 % ¹des cas deviennent des porteurs chroniques, parfois pendant de nombreuses années. Le risque de maladie grave est supérieur chez les personnes qui produisent moins d'acide gastrique, comme les personnes qui ont subi une gastrectomie ou qui prennent des anti-acides ou des antagonistes des récepteurs H₂, ou encore chez les personnes immunodéprimées, exemple les patients qui sont atteints du SIDA ou qui subissent des traitements de chimiothérapie.

Dans les régions où les maladies sont endémiques, la fièvre typhoïde frappe surtout les jeunes de 5 à 19 ans ³³; les cas survenant chez les enfants de moins de 5 ans représentent moins de 5% du nombre total ¹ et la maladie ne s'observe que très rarement chez les enfants de moins de 2 ans ⁴⁰. On ne sait pas exactement pourquoi les enfants de moins de 5 ans risquent moins de souffrir de cette maladie, mais l'observation est importante compte tenu de notre manque de connaissance au sujet de l'immunogénicité du vaccin et de son efficacité dans ce groupe d'âge.

La pauvreté des données sur l'ampleur des maladies bactériennes invasives dans les pays ne voie de développement peut- être expliquée d'une part par les complexité des diagnostics et d'autre part par la rareté de bon laboratoire de microbiologie clinique. C'est ainsi qu'en 2001 le Centre pour le Développement

des Vaccins (CVD) de l'université de Maryland, USA en collaboration avec le ministère de la santé du Mali a créé le Centre pour le Développement des Vaccins au Mali (CVD- Mali) situé dans l'enceinte du Centre National d'appui à la lutte contre la maladie (CNAM) en vue d'assurer un meilleur contrôle des maladies évitables par la vaccination. Le CVD- Mali, après avoir rénové, équipé le laboratoire de microbiologie clinique de l'HGT et formé le personnel a entrepris une surveillance à base hospitalière des infections bactériennes invasives chez les enfants âgés de 0 à 16 ans devant être hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'HGT.

Le présent travail se situe dans ce cadre et s'est donné comme objectifs :

OBJECTIFS

Objectif général

Evaluer le rôle de *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C* dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Gabriel TOURE

Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence des prélèvements des différents liquides biologiques ;
- Identifier les germes dans les prélèvements des différents liquides biologiques des sites stériles ;
- Déterminer la fréquence d'isolement des souches des *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C* des prélèvements des différents liquides biologiques ;
- Déterminer le profil de la sensibilité aux antibiotiques de *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C* par rapport aux antibiotiques couramment utilisés.

GENERALITES

GENERALITES

1.1. HISTORIQUE ⁹

La fièvre typhoïde est une maladie strictement humaine dont l'entité nosologique a été reconnue dès 1813 par Petit et Serres. Elle a constitué un modèle dans l'étude des maladies infectieuses. Cette maladie a été décrite en 1820 par Bretonneau qui l'appelait *dothiéntherie*. En 1880, la mise en évidence du bacille dans les coupes histologiques de ganglions de malades morts de fièvre typhoïde a été faite par Eberth.

En 1884, Gafiky réalise la première culture de ce bacille dénommé *Salmonella Typhi*.

En 1896, Widal a montré que les sérums des malades atteints de fièvre typhoïde, agglutinaient les cultures de bacille d'Eberth, mettant ainsi au point le sérodiagnostic de la maladie. La même année Archard et Bensande, appelèrent bacilles paratyphiques, les souches de bacilles isolées de malades présentant un syndrome typhoïdique mais dont le sérum n'agglutinait pas les cultures de bacille typhique. La même observation fut faite par Gwynn en 1898.

Le nom de *Salmonella* a été donné par Lignières en 1900 à ce groupe bactérien. Ce nom fut choisi en l'honneur de Salmon vétérinaire américain dont la contribution à l'étude de ses bactéries fut majeure.

En 1917, Félix découvre les bases de l'analyse antigénique des bactéries en découvrant les antigènes O et H.

En 1930, Kauffman et White proposent une classification des bactéries proches du bacille d'Eberth basée sur les caractères antigéniques O et H.

En 1935, Reilly, montre le rôle du système nerveux neurovégétatif dans la pathogénie de la fièvre typhoïde.

1948, le chloramphénicol a été découvert de même que ses applications thérapeutiques dans les salmonelloses.

1.2. DEFINITION et SYSTEMATIQUE ²⁵

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des *enterbacteriaceae*, bacilles Gram négatif, mobiles (excepté *Salmonella pullorum-gallinarum*), aéro- anaérobie facultatif, essentiellement des parasites intestinaux des animaux vertébrés ; ils fermentent le glucose avec dégagement de gaz ; lactose négatif (sauf le genre *Arizonae*) ; catalase positive ; H₂S positif ; réaction de Vauges Proskauer (VP) négative .Ils sont responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïdes A, B et C.

Cette famille des entérobactéries comporte actuellement plus de 120 espèces génomiques. Dans le genre *Salmonella*, deux espèces génomiques sont actuellement reconnues : *Salmonella enterica* l'espèce la plus courante qui renferme sept sous-espèces : *enterica* (I), *Salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *indica* et (VI) *subspecies* (VII)) et *Salmonella bongori* espèce rare. Ces sept espèces et sous-espèces sont différenciables à l'aide de caractères biochimiques. Les travaux de taxonomie moderne, en particulier les hybridations d'acides désoxyribonucléiques, ont montré que le genre *Salmonella* ne comporte qu'une seule espèce qui comprend elle-même sept sous-espèces facilement différenciables par leurs caractères phénotypiques. Les sous-espèces I,II et IV correspondent respectivement aux sous-genres I,II et IV de Kauffmann.Celles désignées IIIa et IIIb correspondent respectivement aux sérovars monophasiques et diphasiques des *Salmonella* du sous-genre III de Kauffmann,qui furent successivement appelées *Salmonella.arizona*, groupe *Arizona*, *Arizona arizonae*,et *A.hinshawii*. Enfin,la sous-espèce V a été individualisée en 1982,la sous-espèce VI en 1986.La très grande majorité des

salmonella isolées de l'homme et des animaux à sang chaud appartiennent à la sous-espèce I. A l'exception de certaines régions comme l'Afrique du Sud ou des souches de la sous-espèce II ne sont pas rares chez l'homme, les salmonella des sous-espèces autres que I sont surtout isolées d'animaux à sang froid et de l'environnement et ne sont qu'exceptionnellement la cause de troubles pathologiques chez l'homme.

1.3. HABITAT

Les *Salmonella* sont essentiellement des bactéries de l'intestin des animaux vertébrés ¹¹. Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par

les excréta ^{4, 31, 36}. Elles ne peuvent pas s'y multiplier de manière significative mais peuvent survivre dans le sol pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables. Ces bactéries pathogènes spécifiques provoquent des maladies consécutives à un défaut d'hygiène générale ou à une contamination alimentaire ^{4, 10}.

1.4.- PHYSIOPATHOLOGIE

1.4.1.- Pouvoir pathogène naturel

Les *Salmonelles* sont des entérobactéries à tropisme digestif, elles sont pathogènes pour l'homme et pour de nombreux animaux vertébrés. Elles sont surtout responsables de gastro-entérites à évolution le plus souvent

défavorable ¹¹. Certains sérotypes très virulents apparaissent pathogènes seulement pour une espèce animale donnée ³⁶. C'est le cas de *Salmonella Typhi* et *Paratyphi A, B, C* respectivement responsables chez l'homme de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes,

Les fièvres typhoïdes sont des septicémies caractérisées par une pénétration des salmonelles dans le système lymphatique mésentérique et une multiplication dans les cellules mononuclées qui peuvent ainsi constituer un réservoir à l'origine des rechutes. La localisation au niveau de la vésicule biliaire peut favoriser un portage chronique au niveau digestif³⁴.

Les *Salmonella abortus* et *Salmonella avis* sont pathogènes pour les ovins et *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum* pour les volailles. D'autres salmonelles ont un pouvoir pathogène plus étendu notamment *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et peuvent déterminer des infections chez de nombreuses espèces animales. Ils n'ont pas d'hôtes préférentiels³⁶. Ces sérotypes sont des agents de toxi-infections alimentaires chez l'homme, leur passage dans le sang est exceptionnel³¹, mais certains auteurs soulignent des cas de septicémies graves chez des immunodéprimés^{9, 11, 41} et chez des leucémiques³¹. En outre, ces sérotypes ubiquitaires peuvent provoquer des épidémies dans les services de pédiatrie⁸.

Les *Salmonella* sont enfin responsables de manifestations extra digestives qui, bien que plus rares, surviennent surtout chez des sujets à risque avec des tableaux cliniques multiples en fonction du site de l'infection.

Ces manifestations extra digestives peuvent être isolées ou associées à une septicémie ou à une fièvre typhoïde.

On souligne des ostéites à *Salmonella* chez les drépanocytaires surtout les enfants de 6 mois à 10 ans².

On note un portage fécal ou urinaire chez les malades atteints de schistosomiase^{2, 13, 20}; des infections pleuro-pulmonaires et des infections du système nerveux central dominées par les méningites beaucoup plus fréquentes chez l'enfant ont été mentionnées par certains auteurs^{14, 28}, des infections uro-génitales sont

exceptionnelles quoique des cas aient été cités par différents auteurs ²⁷. Chez des sujets présentant une affection tumorale, ou chez des sujets atteints d'achlorhydrie grave, des infections abdominales (abcès du foie, abcès du pancréas...) autres que les gastro-entérites ont été signalées ²⁶.

Enfin des manifestations cardio-vasculaires à *Salmonella* ²³ dominées par l'endocardite, la péricardite et les atteintes artérielles furent décrites.

1.4.3 PATHOGENIE

Les *Salmonella* sont des bactéries entéropathogènes invasives. A partir d'expérience chez des volontaires sains, la dose infectante a été estimée entre $10^5 - 10^9$ UFC/ml ^{18, 21}. Cette dose dépendra de plusieurs facteurs dont la virulence du germe, l'acidité gastrique du sujet.

Après invasion silencieuse du tube digestif et du système reticulo-endothélial, les salmonelles pénètrent l'épithélium intestinal et l'adhèrent par un mécanisme inconnu, le traversent sans provoquer de lésions importantes pour atteindre la *lamina propia* et la sous muqueuse. Elles induisent des réactions inflammatoires avec afflux de polynucléaires et de macrophages qui phagocytent les bactéries. Les *salmonelles* gagnent ensuite les ganglions mésentériques, s'y multiplient et se propagent dans la circulation sanguine par le canal thoracique. Ce qui explique les septicémies ; une partie des salmonelles se lyse avec libération d'une toxine qui va irriter le sympathique abdominal provoquant par son intermédiaire l'ulcération des plaques de Peyer. Cette toxine transportée au niveau des ventricules cérébraux provoque l'abattement, le typhos d'où le nom de fièvre typhoïde donnée à cette maladie ⁴. L'évolution spontanée cyclique de la fièvre typhoïde non traitée est devenue aujourd'hui

Exceptionnelle ⁶.

1.5. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1.5.1 Morphologie et colorabilité

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif ^{11, 38}.
Pouvant mesurer 2 à 3 μm de long sur 0,6 μm de large pendant leur croissance exponentielle. A l'exception des *Salmonella* appartenant aux sérotypes aviaires, tels *Salmonella gallinarum* et *Salmonella pullorum* et quelques rares mutants immobiles, les *salmonelles* sont généralement mobiles avec une ciliature péritriche ^{11,19}. Voir figure n°1⁴⁶

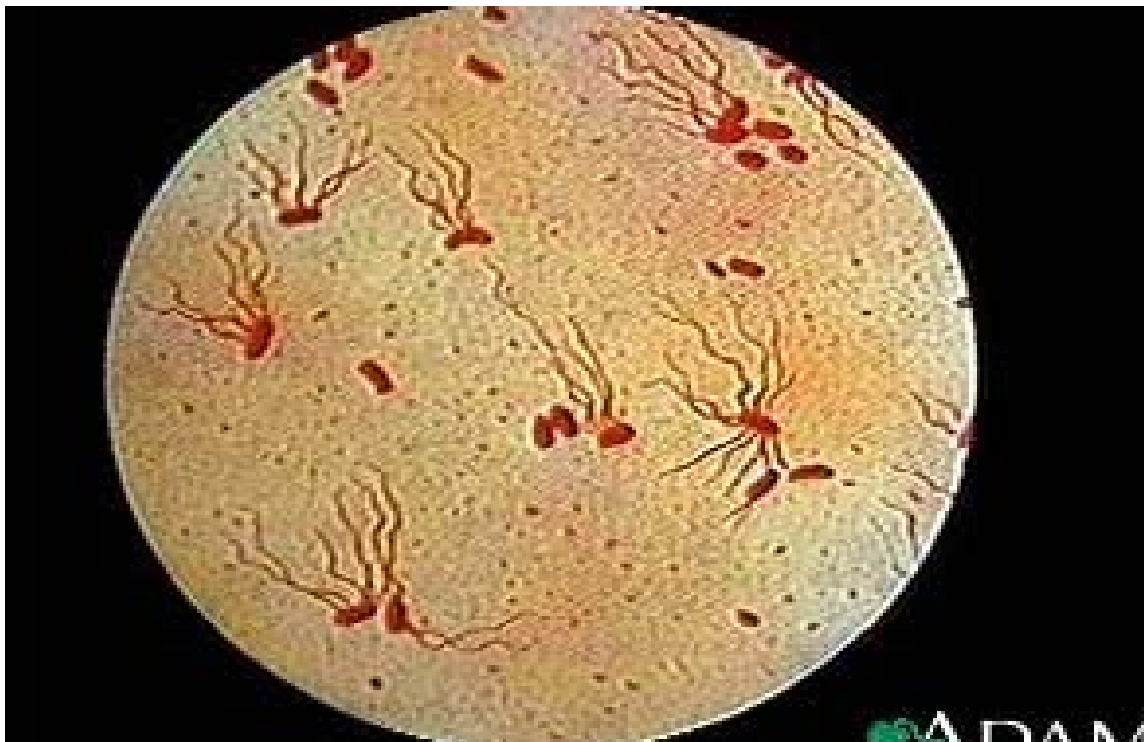


Figure n°1
Les *Salmonella* vues au microscope électronique.

1.5.2. Caractères cultureux et milieux de cultures

Les milieux sélectifs le plus souvent utilisés pour l'isolement des *Salmonella* sont le milieu *Salmonella- Shigella* (SS), le milieu Mc Conkey, le milieu Hecktoen. Sur le milieu S S, les colonies de *Salmonella* apparaissent incolores, à centre noir, car elles ne fermentent pas le lactose et produisent du H₂S. Ces colonies peuvent se confondre à celles d'autres comme les *Proteus*.

Les colonies de *Salmonella* après 18 – 24 heures d'incubation à 37 °C sont lisses et mesurent 2 à 3 mm de diamètre. Des colonies naines s'observent rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à des colonies de *Klebsiella* ³¹. L'aptitude à donner des colonies muqueuses est souvent perdue après quelques mois de conservation.

Présentation des milieux de culture.

- Gélose *Salmonella-Shigella* (Gélose SS).⁴⁷

Milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes. Il est très utilisé pour la recherche de *Salmonella* dans les selles et les denrées alimentaires peu pour les *Shigella* car trop sélectif.

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.


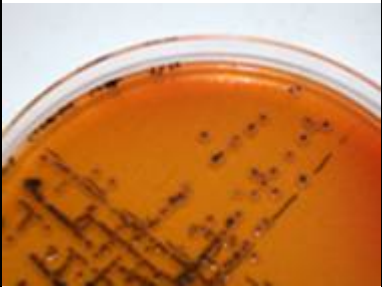
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Isolement par la méthode des cadrans. Incuber 18 à 24 h à 37°C.	Le milieu contient 3 inhibiteurs : sels biliaires, - vert brillant - forte concentration en citrate de sodium. Ceux-ci empêchent la pousse de toutes bactéries Gram ⁺ , et rendent difficile la croissance des bactéries Gram ⁻ autres que Salmonella et Shigella.	Le milieu contient du lactose pouvant être fermenté. Le milieu contient du thiosulfate pouvant donner du H ₂ S.	colonies rouges : lactose + colonies incolores : lactose-
Aspect du milieu après utilisation				colonies à centre noir : H ₂ S ⁺
				

Figure n°2

- Gélose Hektoen ⁴⁷

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement des *Salmonelles* et des *Shigelles*, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur la non utilisation des glucides présents dans le milieu.


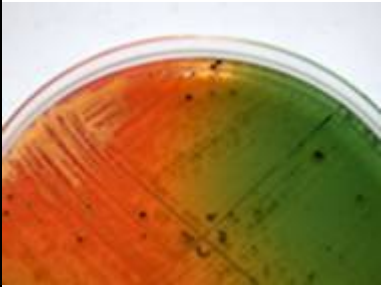
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité composition	Caractères recherchés	Résultats
	L'ensemencement se fait par les techniques habituelles.	Deux indicateurs sont présents dans le milieu : - le bleu de bromothymol (indicateur de pH) - la fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde.	trois types de glucides : la salicine (qui est un hétéroside), le saccharose et le lactose. La production d'H ₂ S à partir de thiosulfate	Colonies saumon à centre noir : <i>Escherichia</i> , <i>Levinea</i> , <i>Citrobacter</i> diversus, <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i>
Aspect du milieu après utilisation				Colonies saumon à centre noir : <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ,
				Colonies bleu-vert à centre noir : <i>Suspicion</i> de <i>Salmonella</i> , à différencier de <i>Proteus mirabilis</i>
				Colonies bleu-vert ou vertes : <i>Suspicion</i> de <i>Shigella</i> ou de <i>Salmonella</i>

Figure n°3

1.5.3 Caractères biochimiques²⁵

Le profil de la majorité des souches de *salmonella* isolées de l'homme et des animaux à sang chaud, appartenant à la sous-espèce I est le suivant :

Urease négative, TDA négatif, Indole négatif, glucose positif avec production de gaz, lactose négatif, adonitol négatif, LDC positive, ODC positive, Citrate Simmons positif, Gélatinase négative, RM positif, VP négatif.

1.5.4. Caractères antigéniques.

Les *Salmonella*, comme toutes les enterobactéries possèdent trois types d'antigènes d'intérêt diagnostiques : Les antigènes de paroi ou antigène O, les antigènes d'enveloppe et les antigènes flagellaires ou H.

1.5.4.1 Antigènes de paroi ou antigène O

L'étude par absorption croisée des immunsérums préparés sur lapin a permis d'individualiser de nombreux facteurs antigéniques, dont 67 sont ou ont été utilisés pour le diagnostic. Les facteurs O désignés par un même symbole sont fortement apparentés mais non obligatoirement identiques, (il en est de même pour les facteurs H).

Les facteurs O peuvent être classés en facteurs O majeurs et facteurs O accessoires.

- Facteurs O majeurs :

Les souches qui ont en commun un facteur O majeur, sont classées dans un même groupe O. Par exemple, le facteur O4 est caractéristique du groupe B : toutes les souches de ce groupe le possèdent. Il en est de même pour le facteur O9 du groupe D, le facteur O2 du groupe A, le facteur O3 du groupe E

- Facteurs O accessoires :

Les facteurs O accessoires sont d'un intérêt diagnostique mineur car ils sont toujours liés à un facteur O caractéristique de groupe. Par exemple, le facteur O12 existe chez toutes les souches des groupes A, B, D, où ils sont liés respectivement à O2, O4, O9. Il est donc sans intérêt diagnostique de le rechercher. Ces facteurs résultent de la modification du polysaccharide lié la spécificité du facteur O majeur par une enzyme à déterminisme chromosomique.

Le facteur 05 résulte de l'addition d'un radical acétyl sur l'abéquose, sucre constitutif du polysaccharide des sérovars du groupe B et qui n'existe pas dans les autres groupes O. Le facteur 05 ne peut donc exister que chez les souches qui ont le facteur 04, si elles possèdent une acétylase de l'abéquose. Ceci explique aussi que les souches fortement agglutinables par le sérum anti 05, sont plus faiblement agglutinables par le sérum anti 04, puisque le 05 est une modification de ce dernier.

1.5.4.2 Antigènes d'enveloppe

Ces antigènes sont peu répandus chez les *Salmonella*. Ils peuvent masquer l'antigène O, rendant les bactéries O inagglutinables. Le chauffage à 100 °C de la suspension bactérienne pendant une dizaine de minutes suffit en général à solubiliser l'antigène d'enveloppe et en conséquence à démasquer l'antigène O qui devient alors agglutinable. On n'en connaît qu'une seule spécificité, appelée Vi parce que découverte par **FELIX ET PITT** chez des souches de *Salmonella Typhi*, qui avaient pensé que la virulence était conditionnée par cet antigène. L'existence de l'antigène Vi n'est connue que chez trois sérovars de *Salmonelle* : *Typhi*, *Paratyphi C* et *Dublin*.

1.5.4.3 Antigènes flagellaires ou Antigènes H

Les flagelles sont des polymères de flagelline, molécules de protéine fibreuse, d'un poids moléculaire de 40 000 environ. Ces molécules d'un diamètre de 4 à 4,5 nm sont disposées sur le flagelle comme les torons d'une corde. La composition en acides aminés de la flagelline est constante pour un type antigénique déterminé. Les anticorps H ont deux propriétés importantes : celle de produire une agglutination floconneuse, d'apparition rapide et dissociable par agitation, et celle d'immobiliser les bactéries, quand leur spécificité correspond à celle de l'antigène des flagelles.

1.5.4.4 Identification d'un sérovar

L'identification d'un sérovar se fera dans l'ordre suivant :

- Détermination du facteur O majeur caractéristique de groupe ;

Seule en pratique *Salmonella Typhi* peut être O inagglutinable quand il est sous forme V. Ses caractères biochimiques très particuliers et une forte agglutinabilité dans le sérum anti-Vi permettent aisément l'identification ; le chauffage à 100 °C permet de démasquer l'antigène O9.

1.6 Nomenclature

Les noms donnés aux *Salmonelle* ne suivent pas les règles habituelles. En raison de leur importance en pathologie, les premières souches isolées ont reçu abusivement un nom d'espèce : l'agent de la fièvre typhoïde humaine fut appelée *Salmonella Typhi*, des bactéries voisines *Salmonella paratyphi*, l'agent de l'avortement des ovins *Salmonella.abortus-ovis*, une *Salmonelle* isolée d'une épidémie chez les souris *Salmonella.Typhimurium*, etc. Ce système de nomenclature a deux grands inconvénients : tout d'abord, il attribue un nom d'espèce à ce qui n'est qu'un sérovar de l'espèce *Salmonelle*. Ces noms sont en

réalité des surnoms donnés pour des raisons de commodité à ces sérovars. D'autre part, ces noms étaient mal choisis quand ils laissaient supposer une spécificité zoologique (par exemple les sérovars *Typhimurium* et *Bovismorbificans* sont ubiquistes), alors que dans d'autres cas ils étaient bien choisis quand il s'agit de sérovars strictement adaptés à une espèce animale (*Abortusovis*, *Abortusequi* par exemple). C'est pourquoi, afin de ne plus commettre d'erreur, les noms que l'on continue à donner aux sérovars de la sous-espèce I indiquent l'origine géographique de la première souche isolée : London, Panama, Stanleyville etc. Cette nomenclature est maintenue pour des raisons de commodité : il est plus aisé d'utiliser ces noms dans le domaine médical où l'on isole presque uniquement des *Salmonelle* de la sous-espèce I. Il n'est pas justifié d'écrire ces noms en italiques puisqu'il ne s'agit pas de nom d'espèce, ni d'en écrire la première lettre en minuscule. La nomenclature la plus convenable pour le travail courant (la nomenclature conforme au code qui devrait indiquer le nom d'espèce, le nom de sous-espèce avant le sérovar, est inutilisable en pratique courante en raison de sa longueur) est de rassembler en un mot les noms qui en comportaient plusieurs et de les écrire en caractères droits avec une majuscule. Exemple : S.I ser.Typhimurium, S.I ser. London, ou en abrégé puisque les noms de sérovars seront à l'avenir conservés uniquement pour ceux de la sous-espèce I, S.Typhimurium ou S. London. Au contraire, les nouveaux sérovars des autres sous-espèces sont désignés uniquement par le chiffre indiquant la sous-espèce concernée, et la formule antigénique, par exemple S.II 17 : b : Z6, S.IIIa 47 : g, Z51 : - , IIIb 42 : 1,v :Z etc. Les noms qui avaient été donnés jadis à certains de ces sérotypes (par exemple S.II Sofia) doivent être abandonnés. Cette nomenclature des sérovars de *Salmonelle* n'est certes pas conforme au Code de Nomenclature des bactéries ni à la nomenclature utilisée pour les autres espèces bactériennes. Elle est un compromis qui a des origines historiques en raison de l'importance médicale de certains sérovars comme *Typhi* et qui utilise pour les sérovars fréquents des noms familiers aux médecins. Il est, pour cette raison

médicale, impossible de l'abandonner. Mais il faut savoir qu'un nom de sérovar de *Salmonelle* n'est pas un nom d'espèce, mais un surnom d'emploi commode donné à un sérovar.

1.7. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1.7.1. Méthode directe

Ce diagnostic repose essentiellement sur l'hémoculture et la coproculture.

1.7.1.1 Sang pour Hémoculture

L'hémoculture permet le diagnostic des bactériémies et septicémies. Sa réalisation doit être conduite avec une grande rigueur, c'est-à-dire au moment des variations brutales de température (ascension). En quelques heures, on peut réaliser jusqu'à 3 hémocultures, ce qui permet d'augmenter les chances de trouver les germes souvent présents de façon intermittente dans la circulation sanguine.

-Prélèvement

Le prélèvement de sang s'effectue par ponction veineuse après désinfection de la peau au moyen d'un antiseptique bactéricide.

La décharge bactérienne dans le sang n'étant pas permanente, il est nécessaire de faire non seulement le prélèvement au moment du pic thermique ou pendant les frissons mais aussi de multiplier le nombre de prélèvement. Ceci permet d'éviter les résultats faussement négatifs.

Le prélèvement doit se faire avant toute antibiothérapie.

-Technique de l'hémoculture

Le volume à ensemercer

Le sang prélevé doit respecter la proportion de 10 ml de sang pour 100 ml de bouillon. Cette dilution a 1/10 permet d'inactiver l'effet bactéricide du sang.

Milieux d'hémoculture

Différents milieux sont préconisés pour les hémocultures :

Milieux liquides.

Ce sont des bouillons de type trypticase soja agar, bouillon cœur cervelle.

Bouillon cœur cervelle ⁴⁷

Milieu de mise en évidence de la respiration sur nitrates, par recherche du nitrate réductase (NR).


Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
		<p>Introduire quelques gouttes de culture liquide à la pipette Pasteur, ou une oese de culture solide, dans le bouillon</p> <p>Homogénéiser.</p> <p>Incuber 24 heures à 37°C.</p>		Test nitrate-réductase	Voir NR

Figure n°4

- Milieux diphasiques
- Hémoline type castaneda.

Trois milieux sont utilisés (gelose sabouraud, gelose Mac Conkey et gelose au sang cuit).

Transport - Enregistrement - Incubation

Les échantillons ou prélèvement sont acheminés rapidement au laboratoire, où on réalise un étiquetage correct mentionnant le nom et prénom du patient, le service, la date, l'heure, la température au moment du prélèvement. Ensuite, elles sont rangées dans l'étuve à 37 °C.

Surveillance

Les hémocultures sont surveillées quotidiennement en vue de déceler un éventuel développement microbien. Cette opération s'effectue pendant 15 à 21 jours après l'ensemencement.

En cas de positivité, c'est à dire de développement microbien, il faut éliminer un contaminant ou germe de souillure tels que *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, les *corynebacteries*, les *streptocoques* non hémolytiques, etc.

Lors des fièvres typho-paratyphoïdiques non traitées de l'adulte, les pourcentages classiques de positivité des hémocultures sont :

90 p. 100 pendant le 1^{er} septenaire

75p. 100 pendant le 2^e septenaire

40p. 100 pendant le 3^e septenaire

10p. 100 pendant le 4^e septenaire.

1.7.1.2. Selles pour Coproculture

-Prélèvement – Transport

Les selles sont recueillies dans des pots stériles et transmises rapidement au laboratoire pour être examinées.

Technique de l'examen bactériologique des selles

. Examen direct

Il se fait généralement sur des selles liquides après étalement sur lame.

L'examen direct permet de décrire le type de la flore mono ou polymorphe avec la présence de polynucléaires et d'hématies.

. Milieux de culture et Ensemencement

On utilise des milieux sélectifs pour *Salmonella* comme le milieu de Rapaport. Ainsi, les cultures sont faites sur milieux d'enrichissement (Mueller Kauffman) et sur milieux d'isolement (Gélose SS, Gélose Hecktoen, ou MacConkey). Ces milieux ensemencés seront placés à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

Au bout de ce temps, on examinera le milieu SS, si les selles contiennent beaucoup de *Salmonella* on aura de nombreuses colonies à centre noir ; si les selles contiennent très peu de *Salmonella*, on aura très peu de colonies ou pas du tout ; dans ce cas, on fera un réisolement sur un milieu d'enrichissement qu'on placera à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. En cas de fièvre typhoïde ou de fièvre paratyphoïde, on aura de nombreuses colonies caractéristiques.

Le maximum de la positivité de la coproculture se situe à la 2^{ème} semaine mais dès la 1^{ère} semaine, cette positivité commence et persiste durant toute la maladie.

- **Milieu Rappaport** ⁴⁷

Milieu sélectif d'enrichissement pour la recherche des *Salmonelles*


Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition
		Ensemencer largement. Incuber 24 h à t°C optimale.	Vert malachite, MgCl ₂ et pH acide => rendent le milieu très sélectif permettant un enrichissement en <i>Salmonella</i> à l'exception de <i>Salmonelle typhi</i> et <i>Salmonella paratyphi A-B</i> et C.

Figure n°5

- Milieu Mac ConKey⁴⁷

Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram⁻ *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques .



Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
		<p>Isolement par la méthode des cadrans.</p> <p>Incuber 18 à 24 h à 37 °C.</p>	<p>Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram⁺ :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les sels biliaires - le cristal violet 	<p>le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre.</p>	<p>colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaires: lactose⁺</p> <p>colonies jaunes ou incolores : lactose⁻</p>

Figure n°6

- **Gélose SS**⁴⁷

Gélose *Salmonella-Shigella* milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes.

Il est très utilisé pour la recherche de *Salmonella* dans les selles et les denrées alimentaires peu pour les *Shigella* Car trop sélectif


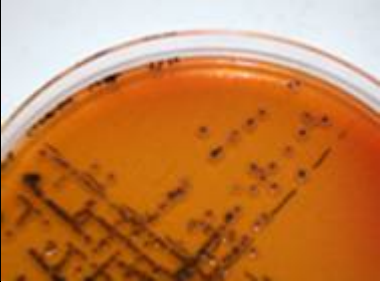
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Isolément par la méthode des cadrans. Incuber 18 à 24 h à 37°C.	Le milieu contient 3 inhibiteurs : -Sels biliaires, -Vert brillant -forte concentration de citrate de sodium. Ceux-ci empêchent la pousse de toutes bactéries Gram ⁺ , et rendent difficile la croissance des bactéries Gram ⁻ autres que <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> .	Le milieu contient du lactose pouvant être fermenté. Le milieu contient du thiosulfate pouvant donner du H ₂ S.	colonies rouges : lactose + colonies incolores : lactose- colonies à centre noir : H ₂ S +
Aspect du milieu après utilisation				
				

Figure n°7

1.7.1.3. LCR et autres prélèvements

On fait un examen microscopique après coloration de Gram puis une culture sur la gélose SS pendant 24 heures à 37 °C. Les colonies suspectes des *Salmonella* sont identifiées au moyen de galeries classiques minimales ou de galerie (Api 20E)

Caractères des souches de Salmonella Typiques, des Salmonella fermentant le lactose sur les milieux de culture.²⁴

Milieux de cultures Caractères observés		<i>Salmonella</i> <i>Typiques</i>	<i>Salmonella</i> 'lactose'+	<i>Salmonella</i> Arizonae
Milieu Kligler	Glucose.....	+	+	+
	Gaz en glucose.	+	+	+
	Lactose.....	-	+	+ ou (-)
	H ₂ S.....	+	-	+ ou (+)
Milieu L.I.A. (Lysine – fer)	Lysine décarboxylase (LDC).....	+	+	+
	Lysine désaminase....	-	-	-
	H ₂ S.....	+	+	+
Milieu Mannitol Mobilité	Mannitol.....	+	+	+
	Mobilité.....	+ en général	+	+
	Nitrate-réductase.....	+	+	+
Milieu Urée- indole	Uréase.....	-	-	-
	Trytophaphane désaminase (TDA)....	-	-	-
	Indole.....	-	-	-
Milieu Malonate de Na	Malonate.....	-	-	+
Test ONPG	Betagalactosidase.....	-	+	+
Milieu de Simmons	Citrate.....	+	+	+
Milieu au KNC	Culture.....	-	-	-

A partir des colonies à centre noir, on réalise une galerie en utilisant soit les galeries classiques (Hajna – Kligler, citrate de Simmons, Mannitol– mobilité, Urée- Indole) soit les galeries modernes Api 20E.

1.7.1.4. Sérogroupage¹²

1.7.1.4.1. Principe

Le sérogroupage permet d'obtenir la formule antigénique qui désigne un sérovar, seul moyen permettant d'individualiser une variété de *Salmonella*.

Le sérogroupage a un intérêt épidémiologique pour déterminer la filiation des cas : soit de fièvres typhoïde et paratyphoïde, soit des cas de gastro-entérites alimentaires.

Dans le sérogroupage, on recherche :

- les antigènes O de paroi
- les antigènes H du flagelle pour les souches mobiles
- les antigènes Vi de la micro- capsule

Le sérogroupage est fait :

- après l'identification biochimique du genre et de l'espèce
- avec une culture pure isolée sur une gélose non sélective
- par une technique d'agglutination directe sur lame mettant en jeu différents antisérum avec la bactérie à tester.

1.7.1.4.2. Cas spécifique de *Salmonella Typhi*

Les bacilles Gram- négatifs qui sont identifiés comme *Salmonella* doivent être confirmés en démontrant leur agglutination avec un antisérum spécifique. Ceci est fait en faisant réagir les micro- organismes avec l'antisérum O polyvalent et l'antisérum Vi. Tous les *Salmonella* réagissent avec l'antisérum O (spécifique pour le carbohydrate O antigènes présents dans les *Salmonella*) et les *Salmonella Typhi* réagissent avec l'antisérum Vi (une capsule thermolabile, antigène présent sur *Salmonella Typhi*). Dans quelques cas, le Vi peut bloquer

les réactions avec le O (aucune réaction avec O et agglutination avec Vi). Dans ce cas, du chauffage de la suspension bactérienne résultera une agglutination avec l'antisérum O (l'antigène O est thermostable) et aucune agglutination avec l'antisérum Vi (les antigènes Vi sont thermolabiles).

Interprétation

- La bactérie non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : agglutination

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination

= *Salmonella* species

2. La bactérie non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : agglutination

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination

= *Salmonella Typhi*

3. La bactérie non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : aucune agglutination

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination

La bactérie chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : agglutination

La bactérie chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination

= *Salmonella Typhi*

- La bactérie non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : aucune agglutination

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination

La bactérie chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* : aucune agglutination

La bactérie chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination.

= autre bactérie (pas de *Salmonella*)

NB : les examens d'agglutination ne sont exécutés qu'après la révélation de l'API 20^E indiquant que le micro- organisme est *Salmonella*, car d'autres bactéries peuvent réagir avec l'antisérum.

1.7.2. Méthode indirecte ¹²

Le diagnostic indirect repose sur le sérodiagnostic de Widal – Félix.

- Principe

Il est basé sur la capacité des anticorps sériques (agglutinines) d'agglutiner une suspension de bactéries tuées. Cette suspension de bactéries est préparée de façon à détruire les flagelles donnant une suspension antigénique O ou à les préserver ; ce qui donne une suspension antigénique H.

- Technique

La détection se fait in vitro en mettant en présence du sérum du malade à une dilution croissante, une quantité constante de suspension antigénique appartenant aux différents sérotypes responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïdes. Le temps d'incubation est de 18 heures et le titre des anticorps est déterminé par la plus forte dilution donnant encore lieu à une agglutination. L'agglutination O, indissociable et granuleuse ⁵ est différente de l'agglutination H qui est facilement dissociable par agitation.

- Evolution des anticorps

Au cours des fièvres typhoïde et paratyphoïdes, les agglutinines O apparaissent vers le 8^e jour, montent à un titre moyen de 1/400 et disparaissent rapidement après la guérison clinique ; les agglutinines H apparaissent un peu plus tard, vers le 10 – 12^e jour, montent rapidement à un titre plus élevé, 1/800 – 1/1600 en moyenne ce titre baisse dans les semaines qui suivent la guérison clinique, mais se maintient à un taux faible (1/100 à 1/200) pendant des mois voire des années après la guérison.

- Interprétation des résultats

Les principales éventualités rencontrées lors de l'interprétation d'un sérodiagnostic de **Widal – Félix** sont résumées dans le tableau I.

Le sérodiagnostic est un test de présomption au diagnostic des fièvres typhoïde et paratyphoïde car de nombreuses réactions antigéniques croisées sont possibles avec d'autres sérotypes de *Salmonella*, ou avec d'autres entérobactéries (*Yersinia pseudotuberculosis*), voire d'autres bacilles Gram Négatifs non apparentés.

Enfin, le traitement antibiotique précoce diminue considérablement, ou même abroge totalement la réponse anticorps en réduisant la stimulation antigénique.

Tableau I
Exemple d'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix⁵

	1	2	3	4	5	6
TO	400	200	200	100		400
TH	800	-	-	-	400	1.600
AO	-	-	-	-		
AH	-	-	-	-	100	100
BO	200	400	-	200	-	200
BH	-	800	-	-	200	200

1. Fièvre typhoïde à la période d'état (coagglutination BO due au facteur 12)
2. Fièvre paratyphoïde B à la période d'état.
3. Possibilité pour:
 - typhoïde au début (avant 10^e jour). A suivre.
 - Salmonellose due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella Typhi*.
 - Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type IV.
4. Possibilité pour:
 - paratyphoïde B au début.
 - Salmonellose due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella paratyphi B*.
 - Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type II.

5. Vacciné par vaccin antitypho- paratyphoïdique A et B (TAB) depuis plus de 3 mois.
6. Fièvre typhoïde chez un vacciné ayant ingéré une grande quantité de *Salmonella Typhi* addition des cas 1 et 5.

1.8 TRAITEMENT

Dans la thérapeutique des fièvres typhoïde et paratyphoïdes, pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il réponde aux critères suivants :

- Avoir une bonne pénétration intracellulaire ^{11, 34};
- Etre éliminé sous forme active dans les selles par la voie hépatobiliaire et dans les urines pour éviter qu'il subsiste des porteurs de germes ³⁴;
- Avoir une bonne concentration lymphatique mésentérique ³⁴.

Le traitement des salmonelloses repose sur l'utilisation des :

- Bétalactamines (ampicilline) et céphalosporines de 3^e génération (Ceftriaxone) ;
- Sulfamides (triméthoprime + sulfaméthoxazole) ;
- Phénicolés (chloramphénicol) ;
- Fluoroquinolones (ciprofloxacine) ;
- Aminosides

Cependant, l'apparition des souches résistantes au chloramphénicol, ou voire des souches multirésistantes mérite une surveillance particulière.

En ce qui concerne les salmonelloses non typhiques, le traitement est mal aisé à codifier.

L'antibiothérapie ne semble pas modifier l'évolution clinique et bactériologique.

1.9 CONTROLE DE L'INFECTION

1.9.1 Epidémiologie

Salmonella Typhi, agent de la fièvre typhoïde, est un germe essentiellement humain ⁶. Elle est cosmopolite ²⁰. La maladie n'est pas endémique en Europe, en Amérique du Nord et en Australie ³⁷. Les porteurs sains qui représentent l'unique réservoir du germe, sont les convalescents qui excrètent le germe dans leur vésicule pendant des mois et les porteurs sains chroniques qui hébergent le germe pendant plus d'un an. Près de 3 à 5p 100 des convalescents éliminent des salmonelles dans leurs selles ^{6, 23} à partir d'un gîte vésiculaire ou dans leurs urines sur des périodes de plusieurs mois.

La transmission du germe, d'un être humain à un autre, se fait par voie orofecale, le plus souvent par l'eau et les aliments contaminés ou les ustensiles souillés.

L'amélioration des conditions socio-économiques dans les pays développés a entraîné une nette diminution du nombre annuel de typhoïde par rapport aux salmonelloses non typhoïdiques ^{3, 10, 44} qui augmentent considérablement.

En revanche, dans les pays où les conditions sanitaires sont précaires, des cas importants d'épidémies sévissent (Afrique, sud-est Asiatique, Mexique...) ⁹.

Les autres *Salmonella* sont responsables d'une infection connue sous divers noms : fièvre paratyphoïde, fièvre entérique et salmonellose.

Les animaux contaminés et ce qu'ils produisent (matières fécales, lait, viande, etc) constituent le plus grand réservoir de ces germes, bien que les humains infectés et porteurs chroniques en constituent une large part. C'est ainsi que les bovidés, la volaille et certains animaux familiers tels que les chiens, les petites tortues sont les réservoirs les plus souvent cités ⁴¹.

Dans les pays en développement, ces salmonelloses constituent l'une des principales causes de mortalité infantile par déshydratation aiguë. Leur prévention est très difficile du fait de la diffusion de ces bactéries chez de multiples espèces animales domestiques ou sauvages.

1.9.2 Prophylaxie

- Vaccination par le Typhim-Vi

Le vaccin Typhim-Vi est une solution injectable d'antigène Vi (virulence) préparée à partir de polysaccharide capsulaire de la souche TY2 (ViPSC) de *Salmonella Typhi*. Le vaccin est fabriqué par Pasteur Merieux distribué sous le nom commercial de Typhim-Vi(MC). Chaque dose unitaire contient 0,5 ug de polysaccharide qui induit une réponse immunitaire humorale et confère une protection contre l'infection. Des essais cas-témoin ont démontré que la réponse sérologique au vaccin était corrélée à l'efficacité de la protection ¹. La dose administrée est la même pour les adultes et les enfants. Le fabricant (Cannaught Laboratories, données inédites) ne recommande pas ce vaccin pour les enfants moins de deux ans.

Il a été démontré qu'une seule dose de vaccin administrée par voie intramusculaire induit une élévation d'au moins quatre fois du titre des anticorps anti-Vi circulants chez la plupart des sujets en bonne santé, mais les sujets âgés de moins de deux ans et les personnes qui possèdent déjà des anticorps répondent généralement moins bien. Chez les personnes qui n'ont pas déjà des anticorps anti-Vi (dont la réponse ressemble vraisemblablement à celle des vaccinés Canadiens), les taux de réponse varient avec l'âge, passant de 63% chez un petit nombre de jeunes enfants de moins de 2 ans, à 86% chez des enfants de 2 ans à 5 ans et 93% à 96% chez des sujets de 5 ans à 45 ans (Cannaught Laboratories, données inédites).

Usage recommandé

Selon les résultats des essais sur le terrain et des études d'immuno-génicité, tous les vaccins contre la fièvre typhoïde sont recommandés pour les groupes suivants :

-Les voyageurs qui se rendent dans des régions où il y a un risque reconnu de contacter la fièvre typhoïde. Cela englobe tous les pays en développement où l'on n'est pas certain de la qualité de l'eau potable.

- Les personnes qui ont un contact étroit par exemple domestique avec un porteur connu de *Salmonella typhi*.

-Les techniciens de laboratoire qui manipulent souvent des cultures de *Salmonella typhi*.

La posologie recommandée pour le vaccin typhim- Vi consiste en une dose unique de 0.5ml injectée par voie intramusculaire. Dans le cas du vaccin Ty21a le programme d'immunisation complet comporte quatre doses, prises à raison d'une capsule tous les deux jours.

Le vaccin Typhim Vi a été homologué pour l'immunisation des personnes ≥ 2 ans. La durée de protection conférée par le vaccin n'est pas bien établie. Le vaccin polysaccharidique maintient une protection immunitaire après 17 mois¹ et 21 mois ; on a noté que les anticorps Vi avaient diminué environ 35% 11 mois après la vaccination et environ 60% après 27 mois²⁹. Une dose additionnelle du vaccin polysaccharidique injectée 34 mois après la dose initiale ramenait le taux d'anticorps à ceux qui avaient été observés après la primo-vaccination. Si l'on prévoit une exposition prolongée au *Salmonella typhi*. Il est recommandé d'administrer des doses de rappel pour maintenir l'immunité. On ne possède aucune donnée sur l'immunogénicité du vaccin Vi

polysaccharidique chez les personnes qui avait déjà reçu d'autres vaccin contre la fièvre typhoïde, mais l'on prévoit qu'une dose de Vi polysaccharidique sera tout aussi immunogène chez ces personnes que chez celles qui n'ont jamais été vaccinées.

Méthodologie

2. Méthodologie

2.1. Présentation de la méthode d'hémoculture:

L'appareil "Bactec 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md." et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bioMérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Les microorganismes présents dans les bouteilles Bactec libèrent du CO₂ qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO₂ libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré-programmés ⁷.

Le système "BacT- ALERT 3D Combination" fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacon est constamment surveillée par un réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le Bactec ^[9].

La capacité de l'automate Bactec 9050 est de 50 flacons. Celle de "BacT- ALERT 3D Combination" est de 120 flacons. Chez chacun de ces fabricants il existe d'autres automates de grande capacité.

Un volume de 2- 5 ml de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans chaque flacon d'hémoculture qui sont saisis dès que possible dans l'appareil pour garantir son efficacité. Il s'agit d'une innovation par rapport à l'hémoculture classique qui demande un volume de 10 ml de sang.

Le Bactec 9050 fonctionne par un système d'agitation continue des flacons versus intermittent des Bactec des séries de grande capacité (Bactec 9120 et Bactec 9240) ⁷.

Il existe 5 types de flacons Bactec :

- BD Bactec TM PLUS /F
- BD Bactec TM LYTIC/10 Anaerobic/F
- BD Bactec TM PEDS PLUS /F
- BD Bactec TM MYCOSIS- IC/F
- BD Bactec TM MYCO/F LYTIC

Le flacon BD Bactec TM PEDS PLUS /F a été utilisé pour sa conception à la détection des germes pathogènes courants chez les enfants, ceci exclut d'autres pathogènes dont la détection est assurée par les autres types de flacons Bactec.

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

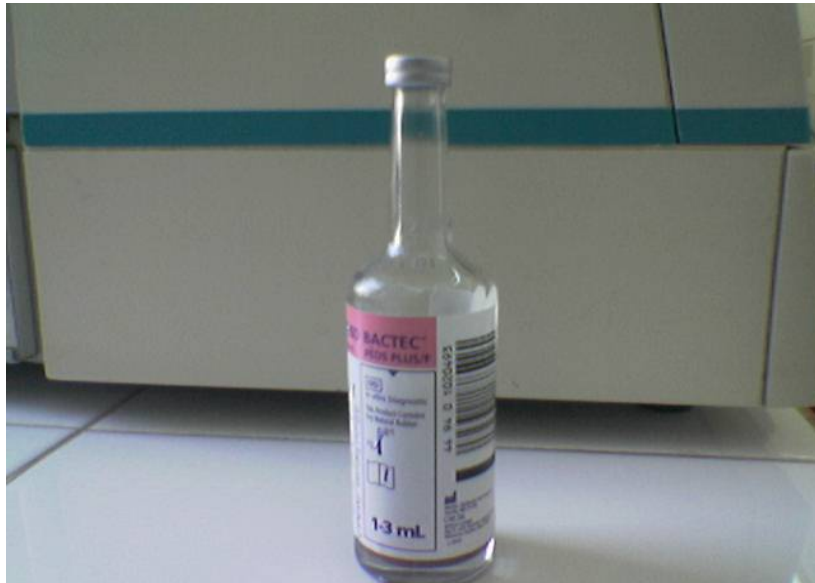


Figure n°9 : flacon BD Bactec TM PEDS PLUS /F



Figure n°10 : BACTEC 9050

2.2. Le Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire d'analyse médicale de l'Hôpital Gabriel TOURE situé dans le centre commercial de Bamako. C'est l'ancien Dispensaire Central de Bamako, devenu le deuxième hôpital national du pays et qui porte le nom d'un jeune étudiant malien en médecine Gabriel TOURE mort à la tâche. Le laboratoire actuel est l'ancienne pharmacie de l'hôpital réaménagée en laboratoire. Il comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle pour les prélèvements et la parasitologie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde, un bureau du chef de service. En 2001 une partie du laboratoire a été aménagée pour les activités de bactériologie et équipée en conséquence avec :

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des Öeses (Labo- CVD).
- 2 automates d'hémocultures Bactec 9050 (Labo- CVD);
- 1 incubateur à CO₂ pour les bactéries aéro- anaérobies (Labo- CVD);
- 1 incubateur sans CO₂ pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20E (Labo- CVD);
- 1 centrifugeuse ;
- 1 congélateur a - 80 °C pour la conservation des souches bactériennes (Labo- CVD);

- 1 congélateur de à - 20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des disques d'identification (Optochine, Bacitracine) des facteurs de croissance des *Haemophilus* ; des réactifs de sérogroupage des *Salmonella*(Labo- CVD) ;
- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs (Labo- CVD);
- 1 micro- ordinateur avec un système de communication Internet (Labo- CVD);
- 1 microscope Olympus CX31(Labo- CVD) ;
- 1 néphélomètre Mc Ferland pour la mesure de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de Kirby Bauer (Labo- CVD);

Des petits matériels divers, des consommables et un ravitaillement régulier en milieux de culture et réactifs permettent de réaliser des activités de bactériologie.

Le personnel comprend :

- un pharmacien biologiste ;
- un pharmacien ;
- des internes ;
- des assistants de biologie.
- des techniciens supérieurs.
- des techniciens de laboratoire, repartis entre les différentes sections de biologie; dont deux de la section de bactériologie ont bénéficié d'un stage de formation à Baltimore (U.S.A)

- Un personnel de surface.

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisées par un Professeur de bactériologie- virologie responsable de l'Institut Nationale Recherche pour la Santé Publique (INRSP).

2.3. L'étude

2.3. 1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective sur trois ans, basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives chez les patients hospitalisés dans le service de pédiatrie.

Après avoir obtenu un consentement éclairé, une hémoculture est réalisée chez chacun des enfants inclus.

Dans certain cas et selon le contexte clinique un examen cyto bactériologique du liquide céphalo- rachidien ou de liquides stériles d'autres sites (lombaire, pleural, articulaire, tissulaire et osseux) est réalisé.

2.3. 2. Durée de l'étude

L'étude a été réalisée sur une période de 3 ans : de février 2002 à décembre 2004, couvrant les trois ans, toutes les saisons y comprises : sèche fraîche, saison sèche chaude, saison pluvieuse.

2.3. 3. Critères d'inclusion et de non inclusion

2.3. 3. 1. Critères d'inclusion

Cette étude porte sur des enfants prélevés au niveau du site de prélèvement de CVD à la pédiatrie et répondant aux critères suivants :

- être âgé de moins de 17 ans,
- être hospitalisé dans le service de pédiatrie de l'HGT,
- avoir une température corporelle ≥ 39 °C à l'admission ;
- avoir une "suspicion d'infection bactérienne invasive" (SIBI) ;
- consentement éclairé des parents est sollicité pour tous les enfants inclus dans l'étude ; en plus l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est obligatoire ;

2. 3. 3. 2. Critères de non- inclusion

Ne prennent pas part à cette l'étude :

- le nouveau- né malade n'ayant jamais quitté l'hôpital depuis sa naissance ;
- l'enfant âgé de 13 à 16 ans incapable ou refusant de donner tout consentement, pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- l'incapacité ou refus du parent ou de l'accompagnant du patient à donner un assentiment.

2.4. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques

Les procédures suivantes sont suivies pour le traitement et l'examen cyto-bactériologique du liquide céphalo-rachidien.

2.4.1. Traitement des prélèvements de LCR

Les prélèvements sont reçus au laboratoire dans des tubes stériles et sont immédiatement identifiés puis enregistrés dans le registre de laboratoire.

Le reste du travail se fera sous une hotte à flux laminaire.

Les tests sur le LCR sont réalisés dans l'ordre suivant :

1. nous identifions les boîtes de gélose ainsi que la lame pour le frottis ;
2. nous déposons sur les géloses au sang de cheval et ou chocolat 2 à 3 gouttes de LCR puis les boîtes de gélose sont refermées. Nous laissons imbiber la gélose par le LCR pendant quelques minutes ;
3. une goutte de LCR est déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis;
4. après avoir laissé sécher le frottis, il est fixé par "chauffage" de la lame à l'incinérateur de la hotte pendant 5 secondes au maximum ;
5. nous remplissons l'hémocytomètre de LCR qui est ensuite laissé au repos pour le comptage cellulaire ;
6. nous ensemençons ensuite les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et la gélose chocolat. Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur à CO₂ en les renversant ;
7. nous réalisons les tests d'agglutination avec le sérum latex Pastorex meningitis kit ;
8. nous procédons à la coloration de Gram ;

Les autres liquides biologiques (liquide pleural, liquide péricardique, liquide articulaire) sont traités comme le LCR.

9. Le reste du prélèvement de LCR est gardé dans le réfrigérateur pendant 5 jours.

Les résultats suivants doivent être notifiés au service de pédiatrie dans les deux heures qui suivent la réception du prélèvement au laboratoire, il s'agit :

- du résultat de la coloration de Gram ;
- du résultat du comptage cellulaire ;
- du résultat des tests d'agglutination.

Nous préparons "une fiche de travail LCR" pour y enregistrer le nom du patient, le numéro de dossier et la date du prélèvement. Tous les résultats des tests sont enregistrés sur cette fiche de travail.

2.4.1.1 Protocole de travail de la Culture du LCR

1. Les géloses au sang et au chocolat sont examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats sont enregistrés sur la fiche de travail.

2. si une colonie bactérienne est observée sur les géloses, une coloration de Gram est effectuée. Les résultats de la coloration de Gram ainsi que la description des colonies sont enregistrés sur la fiche de travail.

Le service de pédiatrie est informé de la positivité de la culture du LCR.

3. nous suivons les procédures d'identification pour les cultures positives.

2.4.1.2 Résultat de la culture

Les milieux sélectifs le plus souvent utilisés pour l'isolement des Salmonella sont le milieu *Salmonella-Shigella* (SS) et le milieu *Hecktoen*. Sur le milieu S S, les colonies de Salmonella apparaissent incolores, à centre noir, car elles ne fermentent pas le lactose et produisent du H₂S. Ces colonies peuvent se confondre à celles d'autres comme les Proteus.

Les colonies de Salmonella après 18 – 24 heures d'incubation à 37°C sont lisses et mesurent 2 à 3 mm de diamètre. Des colonies naines s'observent rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à des colonies de *Klebsiella*³⁰. L'aptitude à donner des colonies muqueuses est souvent perdue après quelques mois de conservation culture la température optimale est de 35 à 37 °C.

2.4.2. Traitement des hémocultures positives et des autres liquides biologiques

2.4.2.1. Protocole de techniques des hémocultures positives

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le Bactec 9050 indique que l'hémoculture est positive :

1. la bouteille du Bactec 9050 est retirée de l'appareil. Sa capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool, ensuite une aiguille de subculture est insérée à travers la capsule et immédiatement après nous préparons une coloration de Gram ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :

- a. Milieu de gélose au sang de cheval ou de mouton ;
- b. Milieu de gélose Mac Conkey ;
- c. Milieu de gélose chocolat ;

Sont écrits sur chaque boîte le numéro du Bactec, les initiales du patient ainsi que la date ;

2. Reporter tous les résultats sur la fiche de travail ;

3. Procéder à la lecture de la coloration de Gram :

a. Si aucun micro- organisme n'est détecté sur la lame de coloration, remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, le flacon de Bactec doit être subcultivé sur la boîte de gélose au sang, la boîte de gélose Mac Conkey et la boîte de gélose chocolat. Les boîtes et la bouteille sont incubées et observées pendant une durée de 5 jours (à compter de l'incubation de la bouteille). La bouteille est encore subcultivée si au bout de ces 5 jours aucun microorganisme n'a toujours pas été identifié ;

b. si des micro-organismes sont détectés, ne plus remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...);

4. Le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

5. si des cocci Gram-positif en paires ou en chaînettes sont observés, placer un disque de bacitracine (A) et un disque d'optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture ;

6. les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO₂.

Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les

boîtes ;

7. lorsqu'une croissance est observée, reporter sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. Faire une coloration de Gram sur ces colonies et reporter les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs genres de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;

8. Si des cocci Gram-positifs sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :

- Enregistrer les résultats des tests des disques d'optochine et de bacitracine ainsi que le test de la catalase ;

- Si le micro- organisme est catalase- positif et ressemble au *Staphylocoque* (cocci Gram-positif en grappes), faire un test de coagulase. Si le micro- organisme est coagulase- positive, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le micro- organisme est coagulase négatif après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative ;

- Si le micro- organisme est catalase- négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine- positif (inhibé par la bacitracine), enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;

- Si le test à la bacitracine ou à la catalase est flou, faire un PYR test. Si le PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;

- Si le micro- organisme est catalase négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine négatif, faire les tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* bêta- hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;

- Si le micro- organisme est catalase négative, optochine- positif (inhibé par le disque d'optochine) et diplocoque Gram-positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant, faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;

Si le micro- organisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci Gram-positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, effectuer le PYR test.

Si le résultat du PYR test est positif, enregistrer le micro- organisme comme étant *Enterococcus species*. Si le résultat du PYR test est négatif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* alpha ou gamma hémolytique selon la réaction d'hémolyse ;

9. Si le micro- organisme est un bacille Gram-positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer seulement «Bacille Gram- Positif» ;

10. Si des bactéries Gram-négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :

- Si le micro- organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey faire un test d'oxydase et inoculer une galerie API 20E. Les Enterobacteriaceae (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase- négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;

- Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais ne pousse pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram-négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il

faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, le confirmer par un test de sérotypage ;

- Si le micro- organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et se présente comme de petits bacilles Gram-négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*. Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;

11. Procéder à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

12. Enregistrer le résultat dans le registre de laboratoire et informer le médecin du patient de l'identification finale.

2.5. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

2.5. 1. Coloration de Gram

Principe :

La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en micro-organismes Gram positif et en micro-organismes Gram négatif. Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et auront une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution d'alcool acétone. Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuschine basique).

C'est parce que la coloration de Gram est très importante, qu'elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

Matériels et réactifs utilisés :

Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100

Huile à immersion

Coffret de colorants de Gram contenant :

- Violet de gentiane ou cristal violet
- Solution de lugol
- Solution de décolorant alcool acétone
- Safranine ou fuschine basique

Lames porte-objet

Portoir de lame

Crayon de papier

Papier buvard

Flacon d'eau distillée

Bac de coloration

Procédure de la coloration :

1. Utiliser une lame propre sur laquelle sont écrits le nom du patient et l'identification du spécimen avec un crayon de papier. Ne pas utiliser de stylo à bille ;

2. Etaler l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre afin de permettre au frottis de sécher à l'air libre. NE PAS SURTOUT chauffer la lame pour faire sécher rapidement le frottis ;
 3. Lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher ;
 4. Recouvrir le frottis de lame avec le Violet de gentiane pendant 30 à 40 secondes ;
 5. Verser le surplus de la solution de Violet de gentiane et rincer la lame avec un jet d'eau faible et ensuite égoutter l'excès d'eau. UTILISER un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;
 6. Recouvrir le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;
 7. Verser la solution de Lugol de la lame et la rincer avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
 8. Goutte à goutte la solution de décolorant alcool- acétone est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
 9. Immédiatement après, rincer la lame avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté ;
- Note : Si la solution alcool- acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes Gram positif pourraient apparaître comme Gram-négatif.
10. Recouvrir le frottis avec la solution de safranine (ou la fuschine basique) pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;

11. Verser la safranine qui une minute plus tard est rincée en tenant la lame sous un faible jet d'eau, l'excès d'eau est égoutté. Prudemment, sécher la lame avec du papier buvard. Ne pas surtout frotter la lame pour la faire sécher.

Interprétation :

La clé dans l'interprétation de la coloration de Gram est d'identifier la morphologie des micro-organismes (exemple : cocci, bacilles) ainsi que leur relation les uns par rapport aux autres (exemple : cellules isolées, en paires, en chaînettes et en grappes). La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de Gram.

Par exemple

Cocci Gram-positif en grappes = *Staphylocoques*

Note : Aucun cocci Gram négatif en grappes n'existe, ainsi les cellules qui apparaissent Gram négatif sont probablement des cocci Gram-positif qui ont été décolorés trop longtemps.

Cocci Gram-positif en chaînettes = *Streptocoques*.

Note : Il n'existe pas de cocci Gram- négatif en chaînettes.

Cocci Gram-positif en paires = *Streptocoques pneumoniae* ou *Entérocoque*

Note : Ces cocci sont allongés et attachés par leur bout.

Bacilles Gram- positif : égale plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles à Gram positif comprenant *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*.

Cocci Gram-négatif en paires = *Neisseria*

Note : Les cocci Gram-négatif les plus connus sont arrangés en pair (diplocoques) et attachés par leur côté. Ils ressemblent à des grains de café.

Bacilles Gram-négatif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles Gram-négatif comprenant *Haemophilis*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

2.5.2. Tests biochimiques et métaboliques

2.5.2.1. Oxydase

Principe :

Le test d'Oxydase est un examen rapide, utilisé pour identifier les bactéries Gram-négatifs. Cet examen est utilisé comme un indicateur redox qui passe d'une teinte incolore (quand c'est réduit) à une couleur violet- foncée (quand c'est oxydé). Les bactéries qui possèdent le cytochrome C sont capables d'éliminer des électrons (oxyde) de cet indicateur redox, cause pour laquelle la couleur change.

Matériels et réactifs utilisés :

Papier buvard

Anse

Réactif d'oxydase : Phénylène- diamine

Procédure :

Mettre une goutte de réactif d'oxydase (exemple : un composé de phénylène-diamine) sur un papier buvard.

Sur une gélose au sang est prélevée une colonie bactérienne et la mettre sur le papier buvard imbibé de réactif d'oxydase.

Interprétation :

Réaction positive = développement d'une couleur violette dans un intervalle de 10 à 30 secondes.

Réaction négative = aucune couleur ne se développe au bout de 30 secondes. Ne pas LIRE le test après 30 secondes à cause des faux- positifs qui peuvent se développer.

Le test d'oxydase est très important pour l'identification des bactéries Gram-négatif. Les bactéries oxydase positives les plus connues sont *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*. Les bactéries oxydase négatives les plus connues sont les Enterobacteriaceae, une grande famille de bactéries qui inclut, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ...

2.5.2.2 Facteurs X et V de Croissance des *Haemophilus*

Un test simple pour l'identification de l'espèce commune des *Haemophilus* est de déterminer leurs exigences pour les facteurs X (Hémine) et V (NAD).

Matériels et réactifs utilisés :

Gélose trypcase soja (TSA) sans sang

Disques de facteurs V, X et X+V

Pinces pour disques d'antibiotique

Procédure :

1. Pour de petits coccobacilles Gram négatifs ou d'autres micro-organismes suspectés d'être des *Haemophilis*, il faut ensemencer ces micro-organismes sur une gélose trypticase soja (TSA) sans sang.

Si le micro-organisme pousse sur la gélose de sang de cheval mais pas sur la gélose Mac Conkey, prendre une colonie isolée vers le bas de la gélose et puis ensemencer toute la surface de la gélose TSA avec cette colonie ;

2. Placer immédiatement des disques X, V et XV sur la gélose. Les disques doivent être bien séparés ;

3. La boîte de gélose est incubée dans l'incubateur à CO₂ pendant une nuit.

4. Enregistrer la croissance ou l'absence de croissance autour de chaque disque.

Interprétation :

1. Si Croissance il y a autour du disque XV mais pas autour des disques X ou V et s'il n'y a pas d'hémolyse sur la gélose au sang = *Haemophilis influenzae*.

2. Ensuite procéder aux tests d'agglutination pour déterminer s'il s'agit de *Haemophilis influenzae* type b

Tout autre modèle de croissance = *Haemophilis species*.

2.5.2.3 Galeries classiques des *Enterobacteriaceae*

-Test à l'ONPG

Principe

Bien que certaines bactéries possèdent une enzyme intracellulaire (E) capable de scinder la molécule de lactose en galactose et glucose (sucre fermenté par toutes

les entérobactéries), comme par exemple la bêta galactosidase (en abrégé β gal) ; elles ne fermentent pas ou fermentent tardivement le lactose.

Chez les bactéries, une autre enzyme (P) (perméase par exemple la galactoside perméase), qui permet la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne, est absente ou n'est pas fonctionnelle.

Le test ONPG est une méthode simple et rapide, qui permet de rechercher directement l'enzyme (E) et par suite de distinguer les bactéries potentiellement lactose positives des bactéries lactose négatives.

Il présente un grand intérêt diagnostique : comme le lactose, l'ONPG (= Orthonitrophényl – β – galactopyranoside) composé incolore, est scindé par l'enzyme (E) en libérant de l'orthonitrophénol soluble en jaune.

Il est préférable de désigner l'enzyme (E) sous le terme générique d'ONPG – hydrolase et d'utiliser l'expression « Test ONPG » plutôt que « recherche de la β – galactosidase ». En effet, si toute bactérie β gal est ONPG⁺, il existe des bactéries β – gal⁻ ONPG⁺.

Technique

Dans un tube de Kahn contenant 0,24 ml d'eau physiologique, faire une suspension dense (laiteuse) d'une culture de la bactérie en étude, prélevée par exemple sur la pente d'un milieu Hajna – Kligler ; y ajouter 0,25ml de solution tamponnée d'ONPG.

Où

Plus simplement, ajouter à une suspension dense dans 0,5 ml d'eau physiologique un disque ONPG ;

Dans les deux cas, incuber au bain marie à 37°C ;

Le test ONPG est positif lorsque la suspension se colore en jaune citron (libération d'orthonitrophénol).

Fermentation des hydrates de carbone

Par définition, toutes les entérobactéries attaquent le glucose avec ou sans dégagement de gaz en produisant des catabolites acides. Les autres hydrates de carbone sont ou bien fermentés rapidement ou bien lentement ou ne le sont pas (absence d'acidification) par les différentes espèces d'Entérobactériaceae (d'où un profil glucidique, utile en diagnostic bactériologique).

Technique

Ensemencer avec 2 à 3 gouttes d'une suspension dense de la bactérie à étudier en eau physiologique ou d'une culture en eau peptonée simple ou en bouillon nutritif ; Incuber à 37 °C ou 30 °C, voire 22 °C

Lecture

Le virage en jaune de l'indicateur indique la fermentation du glucide ; on note éventuellement la présence de gaz dans les cloches.

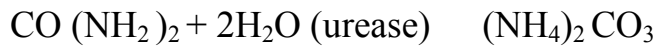
Les lectures sont poursuivies au maximum pendant 7 jours.

-Recherche de l'urease

Principe

L'urease est mise en évidence au moyen du milieu «urée indole» ; milieu synthétique utilisé pour rechercher simultanément l'urease, la tryptophane – désaminase (TDA) et la production d'indole.

Dans ce milieu tamponné, les bactéries qui possèdent une urease suffisamment active, transforment l'urée en carbonate d'ammonium, selon la réaction :



Il en résulte une alcalinisation du milieu dans des délais plus ou moins rapides.

Recherche de l'indole

Principe

Certaines bactéries possèdent une tryptophanase, capable de scinder la molécule de tryptophane en donnant de l'indole suivant la réaction :

A partir de la culture en eau peptonée ou de suspension bactérienne en milieu « urée – indole » ; qui fermentent toutes deux du tryptophane, on peut rechercher la production d'indole à l'aide du réactif de Kovacs (anneau rouge).

Technique

Ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs à une culture de 18 – 24 heures en eau peptonée ou bien à une suspension dense de bactéries en milieu « urée – indole » après 18 à 24h d'incubation à 37° ou 30°C ;

Agiter et laisser reposer

La présence d'indole est relevée par un anneau rouge en surface.

-Recherche du thiosulfate – réductase (production d'H₂S)

Principe :

Cette enzyme permet de réduire $S_2O_3^{2-}$ en S^{2-} . L'anion S peut être relevé grâce à la coloration noire de certains sulfures métalliques : sulfure de fer (milieu Hajna-Kligler), sulfure de plomb (gélose au sous – acétate de plomb).

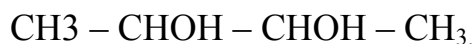
Technique :

La production d' H_2S est recherchée de façon systématique sur le milieu de Hajna-Kligler dont on ensemence le culot par piqûre et la surface inclinée par stries, serrées et parallèles (noircissement plus ou moins prononcé de la pente et principalement du culot). La sensibilité de ce milieu est telle qu'il permet de déceler des traces d' H_2S .

- Réaction de Voges- Proskauer,

Principe :

Les bactéries dites Voges – Proskauer positives (VP^+) possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique $CH_3CO - COOH$, produit d'oxydation du glucose, elles peuvent former de l'acétyl méthyle carbinol (= acetoïne) : $CH_3CO - CHOH - CH_3$ et du butane diol 2-3 :



La présence de ces deux composés est décelée par la réaction de VP : en milieu fortement alcalin, ils sont oxydés en diacétyl : $CH_3 CO - COCH_3$, qui réagit avec le groupement guanidine des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge cerise ; l'alpha – naphтол accélère cette réaction colorée.

D'une façon générale, les produits de dégradation obtenus par les bactéries qui possèdent cette voie métabolique, présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle : RM^+)

A l'inverse des bactéries comme *Escherichia coli*, qui attaquent les glucides selon une voie métabolique différente (Voie d'Embden – Meyerhof), sont VP négatives et produisent à partir du glucose des métabolites plus acides que précédemment (Virage au rouge du rouge de méthyle : RM^+)

Technique rapide

.dans un tube de 22 x 220 mm, verser 1ml de milieu de Clark –Lubs,

.ensemencer avec une goutte d'une suspension bactérienne dense d'eau physiologique ou distillée,

.incuber pendant 18 24 heures à 37° OU 30° ou 22° C,

.après ce délai, ajouter 0.5 ml d'une solution alcoolique d'alpha naphthol (6g d'alpha naphthol dans une quantité suffisante d'alcool à 90° pour 100ml) et 0.5 ml de N_aOH 4N

.chauffer avec précaution sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à commencement d'ébullition,

.agiter pendant 30 secondes sur un agitateur vibreur type vortex. Une coloration rouge cerise franche indique une réaction de VP positive. Elle est stable pendant une heure (milieu CL)

- Milieu synthétique au citrate de Simmons

Principe :

le milieu au citrate de Simmons est un milieu minéral synthétique tamponné avec comme source d'azote un sel d'ammonium et comme source unique de carbone et d'énergie du citrate, dont l'utilisation en aérobiose par certaines bactéries se traduit par leur croissance et l'alcalisation du milieu. Les

entérobactéries, qui exigent des facteurs de croissance (auxotrophes, par exemple : *Salmonella Typhi* et les *Shigella*), ne peuvent pas pousser sur ce milieu.

Technique

par une strie centrale et longitudinale, ensemercer la pente avec une anse chargée d'une culture prélevée sur un milieu gélosé ou d'une suspension bactérienne en eau physiologique ou distillée ;

N'utiliser en aucun cas de cultures en brouillon ou en eau peptonée, qui apporteraient avec les bactéries des éléments nutritifs, capables de fausser les résultats.

Ne pas visser à fond la capsule métallique (pour permettre au CO₂, provenant de la décarboxylation du citrate de s'échapper) ;

Incuber à 37°, 30°, 22° pendant 7 jours au maximum.

Les bactéries capables d'utiliser le citrate comme source de carbone et d'énergie et pourvues d'une citrate- perméase, poussent sur le milieu de Simmons en l'alcalinisant (virage au bleu de l'indicateur), à l'inverse des bactéries citrate de Simmons négatives.

- Recherche des décarboxylases et dihydrolase (LDC, ODC, ADH)

Principe :

Les décarboxylases sont des enzymes qui décarboxylent les acides aminés en formant l'amine correspondante avec dégagement de CO₂.

Les décarboxylases présentant un intérêt taxonomique sont :

- la lysine – décarboxylase ou LDC (lysine → cadavérine) ;
- l'ornithine – décarboxylase ou ODC (ornithine → putrescine) ;
- l'arginine – décarboxylase et dihydrolase ou RDH (arginine → agmatine et ornithine).

La synthèse de ces enzymes est favorisée par un pH acide (3,5 – 5,5) et des conditions d'anaérobiose.

Il existe deux types de méthode pour leur recherche :

Alcalinisation de milieux glucosés par l'amine formée ;

Extraction de l'amine formée par un solvant organique et sa caractérisation par la réaction colorée qu'elle donne avec la ninhydrine.

Technique :

A partir d'une culture sur milieu gélosé nutritif, préparer une suspension bactérienne dense (environ 10^9 bactéries/ml)

Ensemencer les tubes 18 x 145mm en recouvrir la surface avec environ 1 à 2ml de l'huile de vaseline ;

Dans la pratique, on peut ensemencer un tube témoin.

En effet, chez les entérobactéries, l'un au moins des trois milieux renfermant un amino-acide fournit un résultat négatif le premier jour des lectures et peut servir de témoin (virage en jaune) ;

Incuber pendant quatre jours au maximum à 37° ou 30° ou 22°C, en fonction de la température optimale de croissance de la bactérie en étude

Lecture

S'assurer qu'il y a croissance dans les tubes (trouble) et fermentation du glucose (sinon, le diagnostic sera orienté vers une bactérie aérobic stricte) ;

Coloration jaune : absence de décarboxylase

Coloration violet améthyste : présence d'une décarboxylase.

Pour l'ADH, se tenir compte que d'un virage violet franc (interférence de plusieurs enzymes)³⁰.

- Milieu de Hajna-Kligler⁴⁷

Le milieu de Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.


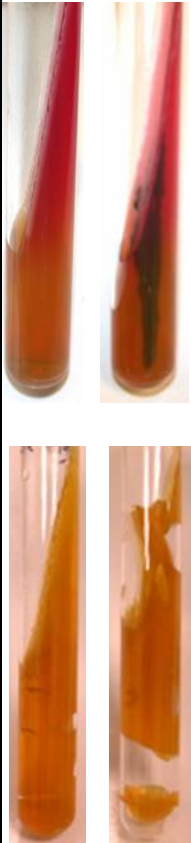
Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
		<p>Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux.</p> <p>Mettre à l'étuve 24h à 37 °C.</p>	<p>Extraits de viande, de levure, digestat enzymatique de caseine, NaCL, lactose, glucose, sulfate ferreux amoniacal, thiosulfate de sodium, rouge de phenol, et Agar-agar</p>	<p>Utilisation du glucose</p> <p>Utilisation du lactose</p> <p>Production H₂S</p> <p>Production de gaz</p> <p>Recherche de la LDC</p>	<p>a) Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose + : culot jaune et pente jaune.</p> <p>b) Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose - : culot jaune et pente rouge.</p> <p>c) Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose - et lactose - : culot rouge et pente rouge.</p> <p>d) Bactérie de type oxydatif du glucose et lactose + : culot rouge et pente jaune.</p> <p>Ces bactéries sont aérobies strictes : le culot ne doit pas présenter de culture et sera donc rouge. La pente peut présenter une culture et sera jaune si l'acidification est suffisante et rouge dans le cas contraire. Le milieu de Kligler n'est généralement pas utilisé pour de telles bactéries, qui sont souvent lactose -, et des expériences complémentaires sont faites pour préciser le résultat.</p>

Figure n°8

- Milieu citrate de Simmons⁴⁷

Ce milieu est un exemple de milieu synthétique, c'est à dire de milieu dont la composition, qui est complexe, est connue exactement tant qualitativement que quantitativement

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.



Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
		<p>La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.</p> <p>Il est important de ne pas apporter de substrats carbonés. Ainsi l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonée est impossible.</p> <p>Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Mettre à l'étuve à 37°.</p>		Utilisation du citrate comme seule source de carbone	<p>-Virage de l'indicateur du Ph en bleu</p> <p>il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.</p> <p>Pas de virage de l'indicateur de ph : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons -.</p>

Figure n°9

- Milieu urée -indole

On utilise ce milieu pour mettre en évidence la décomposition de l'urée (présence d'urease).

2.5.2.4 Galerie moderne API 20E

Le Système d'Identification API 20 E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant la nuit dans un incubateur en aérobiose, et ensuite interprétés.

2.5.3. Tests immunologiques : Tests d'agglutination Slidex méningite Kit

Principe

Les réactifs Slidex méningite, constitués de particules de latex sensibilisées par des antisérums spécifiques, permettent, par une technique d'agglutination rapide sur carte, de détecter l'antigène correspondant dans le LCR.

Matériels :

Le coffret contient :

Réactif R1 : Latex *Haemophilus influenzae* type b

Réactif R2 : Latex *Streptococcus pneumoniae*

Réactif R3 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe A

Réactif R4 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1

Réactif R5 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe C

Réactif R6 : Contrôle Positif, extrait antigénique de : *Haemophilus influenzae* type b

Streptocoques pneumoniae, *Neisseria meningitidis* groupe A *Neisseria meningitidis* groupe B, *Neisseria meningitidis* groupe C.

Cartes jetables

Bâtonnets jetables

Mode opératoire :

- Traitement des liquides céphalo- rachidiens

Chauffer systématiquement les LCR à 100 °C pendant 5 minutes

Centrifuger 10 minutes à 2000 tours/ minutes, et récupérer le surnageant.

Le surnageant constitue l'extrait à tester.

- Méthodologie :

1- Amener les réactifs à une température ambiante comprise entre 18 et

25 °C.

2- Bien remettre en suspension les réactifs latex. Chasser les gouttes des réactifs retenues dans le compte- gouttes.

3- Déposer sur une carte, dans les emplacements prévus à cet effet, une goutte de chacun des latex.

4- A chacune des gouttes, ajouter 30 µl de surnageant de l'échantillon à tester.

5- Mélanger le contenu de chaque cercle, en utilisant toute la surface, à

L'aide d'un bâtonnet (utiliser une extrémité propre de bâtonnet pour chaque cercle).

6- Imprimer à la carte un léger mouvement de rotation pendant 2 minutes maximum et lire sous éclairage normal sans utiliser de loupe.

- Lecture :

Réaction négative : suspension homogène.

Réaction positive : apparition d'une agglutination en moins de 2 minutes.

- Interprétation des résultats :

Une réaction positive avec l'un des réactifs latex témoigne de la présence dans le liquide biologique de l'antigène correspondant.

Une réaction positive avec le latex R₄ (*Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1), chez un nouveau-né ou un prématuré, traduit dans la majorité des cas la présence de *Escherichia coli* K1, chez un sujet plus âgé, elle traduit plus probablement la présence de *Neisseria meningitidis* B.

En cas d'apparition d'une agglutination en moins de 2 minutes avec deux réactifs latex ou plus, la réaction est ininterprétable.

2.6. Test de Sensibilité des antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques in vitro selon Kirby- Bauer. Pour tester la sensibilité, d'importants isolats en clinique. Les résultats de cet examen peuvent aider les médecins dans la sélection de l'antibiotique approprié pour la thérapie.

Principe :

La méthode de diffusion des disques selon Kirby- Bauer est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du micro- organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon les résultats ne seront pas précis.

Matériels et réactifs utilisés :

Gélose de Mueller- Hinton additionnée de 5% de sang de cheval (MHA- B)

Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)

Solution saline stérile à 0,85 ‰

Standard 0,5 de Mc Farland

Disques antibiotiques pour test de sensibilité

Ecouvillons en coton stériles

Pipettes à sérum

Pinces à disques et/ ou applicateur de disque

Conditions de stockage nécessaires :

1. milieux de culture (MHA- B et HTM) : A conserver au réfrigérateur, ils doivent être réchauffés à la température de la salle avant leur utilisation. Les boîtes non- stockées dans des sacs en plastique se déshydrateront et ne pourront pas être utilisées convenablement ;
2. solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur ;
3. standard 0.5 de Mc Farland : A conserver au noir dans un récipient. Ne pas utiliser de tube rayé. Le diamètre du tube doit être le même que celui des tubes de solution saline utilisés pour la préparation des tests d'inoculum ;
4. disques d'antibiotiques : Congeler les disques à -20°C ou à une température plus basse pour de longue conservation ;
5. dès qu'une boîte est ouverte pour usage, elle peut être conservée au réfrigérateur dans une capsule bleue de 50 ml ensemble avec le dessiccateur.

Procédure du test :

1. les boîtes de gélose doivent être réchauffées à la température de la salle avant qu'elles ne soient inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais de gouttelette d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le micro-organisme ;
2. la gélose HTM (gélose spéciale) est utilisée pour les tests *Haemophilus*. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests ;

3. Enlever du réfrigérateur les disques pour le test de sensibilité afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle. Au paravent ils auront été enlevés du récipient de conservation. Il ne faut pas exposer les disques froids à l'air de la salle parce que la condensation de l'humidité sur les disques froids conduirait à une détérioration rapide des antibiotiques. Vérifier les dates d'expiration sur les boîtes d'antibiotiques.

Ne pas utiliser de disques périmés ;

4. Sélectionner au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Toucher le sommet de chaque colonie avec une anse et nous les transférons dans un tube de solution saline. Ajuster l'inoculum de la solution saline à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de Mac Farland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté ;

5. Plonger un écouvillon stérile dans la suspension ajustée. Il est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. Inoculer la surface entière de la boîte de gélose en faisant tourner la boîte d'approximativement d'un angle de 60 ° et ensemençer de nouveau. Faire tourner la boîte et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;

6. Inoculer une boîte pour *Haemophilus influenzae* ; pour *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ; deux boîtes de gélose sont inoculées pour les autres bacilles Gram négatifs ;

7. Laisser l'excès d'humidité s'absorber par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. Placer les disques d'antibiotique sur la boîte en utilisant des pinces stériles. Le disque est pressé sur la surface de la

gélose avec des pinces stériles pour s'assurer du contact complet avec la surface de la gélose. Ne plus enlever le disque une fois qu'il est arrivé au contact avec la surface de la gélose parce que l'antibiotique diffuse dans la gélose presque immédiatement.

Utiliser souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques ;

8. les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

a. pour *Streptococcus pneumoniae*: Oxacilline 1 µg (pour le test de Pénicilline 10 UI), Céftriaxone 30 µg, Erythromycine 15 µg, Chloramphénicol 30 µg ;

b. pour *Staphylococcus aureus*: Pénicilline 10 UI, Oxacilline 1 µg, Céftriaxone 30µg ;

c. pour *Haemophilus influenzae*: Ampicilline 10 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ;

d. pour les autres bacilles Gram négatif

I. boîte de gélose N°1- Ampicilline 10 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.

II. boîte de gélose N°2- Gentamicine 15 µg, Cotrimoxazole 25 µg, Ciprofloxacine 5 µg.

9. Laisser les boîtes pendant 15 minutes après que les disques aient été déposés avant l'incubation proprement dite.

Les espèces *Streptococcus* et *Haemophilus* sont placées dans l'incubateur à CO₂

Tous les autres micro-organismes devraient être placés dans un incubateur en aérobiose.

Interprétation :

1. tous les tests de sensibilité sont lus après 20 à 24 heures d'incubation. Si les examens sont lus plutôt ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis ;

2. Mesurer les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte. Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins.

3. La limite est l'aire dans laquelle une croissance évidente est visible à l'œil nu, excepté la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.

a. la croissance de larges colonies à l'intérieur d'une zone d'inhibition claire devrait indiquer un mélange de croissance. Si tel est le cas alors la sensibilité est mixée, reprendre le test. Si les colonies persistent dans la zone, il faut les considérer comme significatives ;

b. avec le Cotrimoxazole, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. Nous ne tiendrons pas compte de la faible croissance, nous devons lire seulement les limites de la croissance en abondance ;

c. Se référer à la « carte de référence » pour l'interprétation des tests ;

d. les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 1 µg est utilisé. Ne pas reporter les résultats comme Oxacilline mais plutôt les reporter comme Pénicilline.

Compte-rendu :

1. reporter les résultats dès que l'identification du micro- organisme est complète ;

2. si le profil de sensibilité est atypique pour le micro- organisme identifié, l'identification et le test de sensibilité devraient être repris. Si les résultats restent atypiques, ils pourraient être discutés avec le superviseur du laboratoire ou le directeur avant de les reporter ;

3. quelques résultats avec les tests des disques de diffusion pourraient être irréalisables. Les micro-organismes fastidieux ou lents en croissance ne pourraient pas être testés par la méthode. En plus, des combinaisons de micro-organismes et d'antibiotiques ne peuvent pas être testés de façon fiable avec la méthode de diffusion des disques. Les guides suivants seraient utilisés pour ces micro- organisme:

a. reporter comme résistants tous les tests de *Salmonella* et *Shigella* avec des Aminoglycosides et les Céphalosporines de première et seconde générations ;

b. si le *Staphylococcus* est résistant à l'Oxacilline, reporter Pénicilline et Céftriaxone comme résistants sans tenir compte de ce que le test du disque indique.

2.7. Conservation des cultures pures ²⁴

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence. Elles sont fréquemment utilisées pour l'enseignement, le contrôle ou pour la recherche. L'intérêt de se référer à des souches standard est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis. En Angleterre, la plus connue est la «National Collection of Type Cultures» (NCTC). En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris. Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître.

Deux possibilités sont offertes aux collectionneurs pour maintenir les souches en survie et leur conserver toutes leurs propriétés. On peut simplement les cultiver sur des milieux adaptés et les transférer périodiquement sur des milieux neufs. Il est nécessaire de bien connaître le milieu le plus convenable, la température la plus favorable et la durée limite de stockage. Les précautions élémentaires suivantes sont prises pour assurer cette conservation :

1. La dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou mieux en les scellant au chalumeau.
2. La culture est conservée à l'abri de la lumière ou à la température du laboratoire ou dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+ 4 °C).

3. Le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée, ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot, ensemencée par piqûre centrale.

Ainsi peut-on procéder avec les bactéries à croissance rapide comme le sont les *Entérobactéries*, les *Staphylocoques*, etc. Pour de nombreux autres germes, on aura recours à des milieux particuliers : sérum coagulé pour les *Corynébactéries*, gélose pomme de terre pour les *Brucellae*, gélose sans peptone pour les *Bacillus*, etc.

Les souches isolées dans notre cas d'étude sont conservées par congélation.

Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent sa mise en œuvre : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.

Pour conserver dans les meilleures conditions les structures cellulaires, il convient de les congeler à la température la plus basse et d'y parvenir dans les délais les plus brefs.

Les souches sont conservées dans un congélateur de -65°C à -90°C .

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D

N° B-P

N° D et G I

I P /E₂

E = Etage du congélateur ; B = Bloc ; T = Tiroir ; D = Date

N° B-P : numéro de la boîte et position de la souche

N° D et G I : numéro de dossier du patient et germe isolé

I P /E₂ : initiale du patient /Etude 2

2.8. Eléments de l'assurance qualité

Pour l'assurance de qualité, les procédures suivantes sont suivies :

1. L'identification des spécimens
2. L'enregistrement dans les registres de travail
3. La saisie des résultats
4. Le contrôle de qualité consistant en :
 - a. Le suivi des appareils

1. Le relevé des températures quotidiennes : On procède à un relevé quotidien des températures pour les appareils suivants :

- Congélateur de conservation des souches, température = - 65 à - 90 °C.

- Congélateur de conservation des disques d'antibiotiques et des facteurs d'identification, température = - 20 à - 30 °C.
- Réfrigérateurs de conservation des réactifs et des milieux de cultures, température = 2,8 à 8 °C.
- Automates d'hémoculture Bactec 9050.

2. Le suivi du niveau d'eau de l'incubateur : De l'eau distillée est utilisée en vue du ravitaillement en eau de l'incubateur.

3. Le nettoyage des filtres : Les filtres situés sur les côtés latéraux des Bactec sont nettoyés régulièrement.

4. Le contrôle de la turbidité de l'étalon de solution utilisé sur l'appareil Mc Ferland

b. Le contrôle de la qualité des réactifs et des milieux de culture :

Les réactifs et les milieux de culture sont contrôlés en utilisant les souches de référence suivantes :

- *Streptococcus pneumoniae* A T C C 49619 ;
- *Haemophilus para- influenzae* A T C C 7901 ;
- *Haemophilus influenzae type b* A T C C 49247 ;
- *Streptococcus* groupe B A T C C 12386 ;
- *Staphylococcus aureus* A T C C 25923 ;
- *Streptococcus* groupe A A T C C 19615 ;
- *Escherichia coli* A T C C 25922

Les milieux et les réactifs utilisés sont :

1. Les milieux de culture : gélose au sang de mouton et ou gélose au sang de cheval, gélose Mac Conkey, gélose Müeller Hinton, gélose chocolat, gélose trypticase soja.

2. Les réactifs permettant la réalisation des techniques suivantes :

Coloration de Gram, test de catalase, test de coagulase, test d'oxydase.

3. Les réactifs permettant la révélation de la galerie API 20 E,

4. Les disques de facteurs X, V et X+V, les disques d'optochine, les disques de bacitracine.

RESULTATS

RESULTATS

Seul le résultat de la culture finale a été pris en compte pour les germes.

Les Bacilles Gram Positifs (BGP), *Staphylococcus* à coagulase négative sont des contaminants.

TABLEAU II : Total des prélèvements effectués à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2004

ANNEES	PRELEVEMENTS					
	Hémocultures		LCR		Autres liquides	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
2002	1978	36%	788	28,07%	47	30,92%
2003	1672	30,53%	981	34,95%	54	35,53%
2004	1844	33,67%	1038	36,98	51	33,55%
Total	5494	100%	2807	100%	152	100%

TABLEAU III

Fréquence d'isolement des *Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C* de 2002-2004

Germes	Hémocultures	LCR	Autres liquides
Salmonella Typhi	89	1	0
Salmonella groupe A	2	0	0
Salmonella groupe B	32	1	0
Salmonella groupe C	2	0	0

TABLEAU IV

Fréquence d'isolement des *Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C* de 2002-2004

Germes	Hémocultures			LCR			Autres liquides		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004	2002	2003	2004
Salmonella Typhi	56	20	13	1	0	0	0	0	0
Salmonella groupe A	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Salmonella groupe B	16	11	5	0	0	1	0	0	0
Salmonella groupe C	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Résultat des cultures

TABLEAU VII: Résultats des Hémocultures effectuées à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2004

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
Hémocultures	Bactec positif	Cultures avec germes	1000	18,20
		Cultures avec contaminants	476	8,66
		Cultures négatives	36	0,66
	Total	1512		
	Bactec négatif	Cultures négatives	3982	72,48
Total			5494	100,00

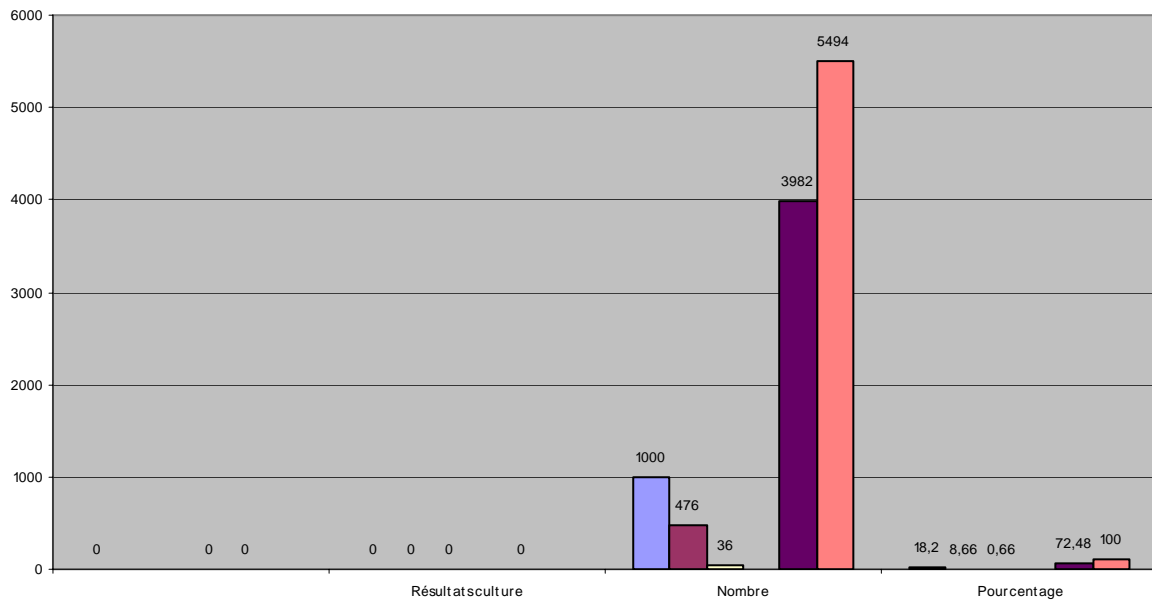


Figure 12 : Résultat des hémocultures

TABLEAU VIII : Résultats des LCR effectués à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2004

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
LCR en culture sur gélose	Cultures positives	Cultures avec germes	575	20,48
		Cultures avec contaminants	840	29,93
	Cultures négatives	négative	1392	49,59
Total			2807	100,00

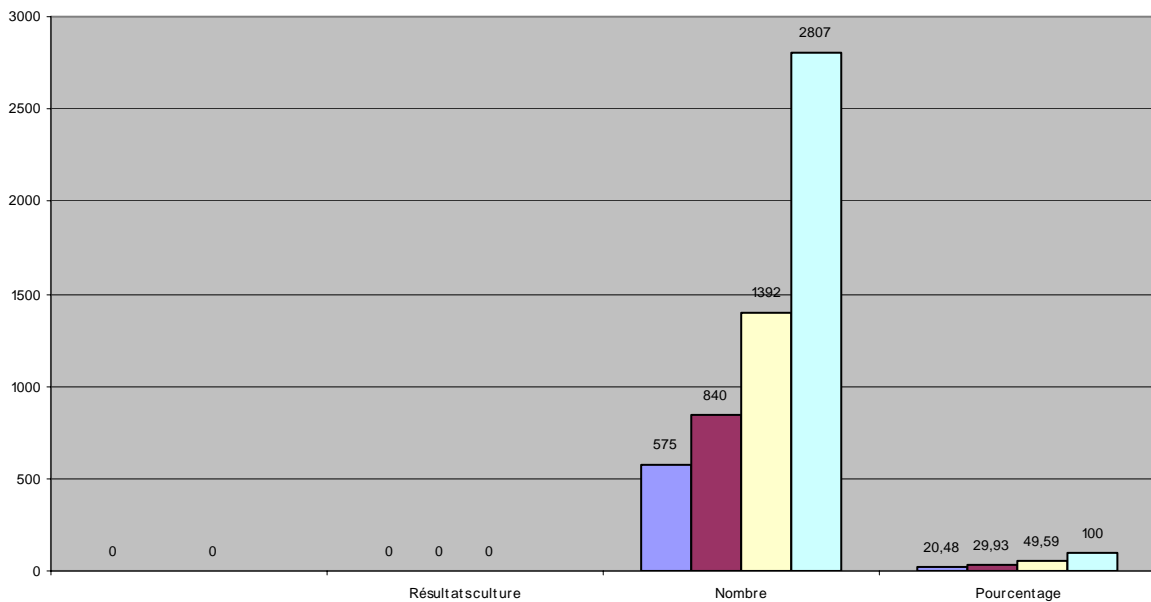


Figure 13 : Résultat du LCR

TABLEAU IX : Résultats des prélèvements des autres liquides biologiques effectués à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2004

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
Autres liquides en culture sur gélose	Cultures positives	Cultures avec germes	89	58,55
		Cultures avec contaminants	16	10,53
	Cultures négatives	négative	47	30,92
Total			152	100,00

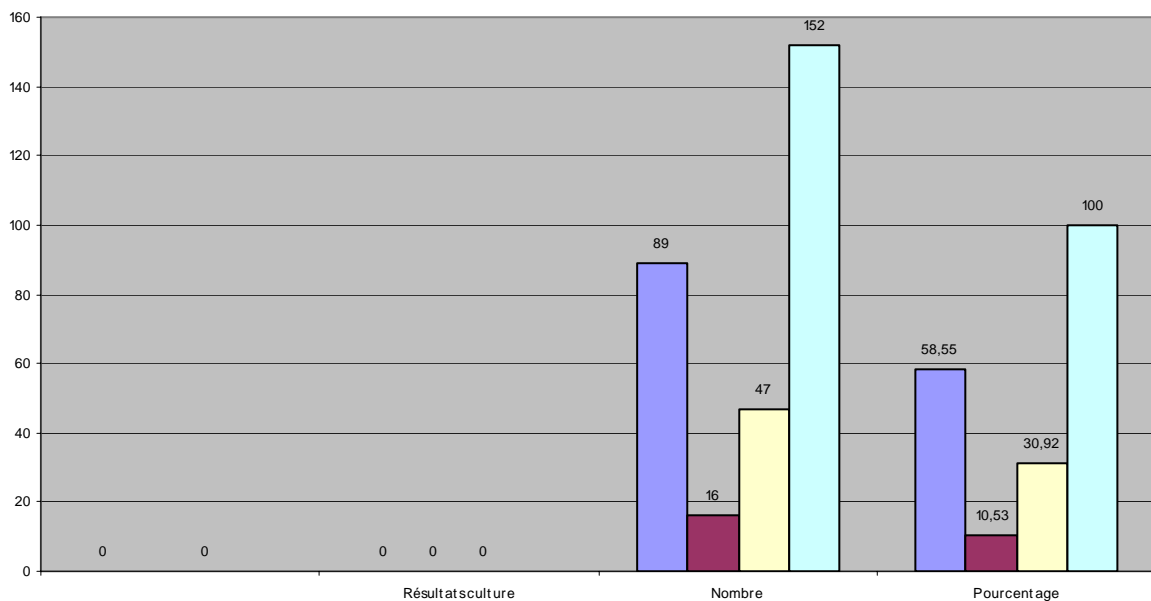


Figure 14 : Résultat des autres liquides biologiques

TABLEAU V : Les espèces bactériennes isolées des hémocultures au laboratoire de bactériologie- CVD de 2002 à 2004.

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
Total	1960	1672	1843	5494	100
Résultats négatifs	1471	1182	1328	3982	72,48
Résultats positifs	489	490	515	1494	27,28
Nature des germes isolés					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	78	100	115	293	5,33
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	12	99	122	233	4,24
<i>Salmonella spp</i>	60	48	39	147	2,68
<i>Salmonella typhi</i>	56	20	13	89	1,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	29	27	79	1,44
<i>Escherichia coli</i>	17	08	17	42	0,76
<i>Salmonella paratyphi B</i>	16	11	06	32	0,58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	03	05	11	0,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	06	02	11	0,20
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	02	08	01	11	0,20
<i>Streptococcus</i> non hémolytique	03	06	01	10	0,18
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	01	04	04	09	0,16
<i>Streptococcus</i> groupe A	03	02	03	08	0,15
<i>Enterococcus spp</i>	01	01	05	07	0,13
<i>Streptococcus</i> groupe B	04	01	01	06	0,10
<i>Morganella morganii</i>	01	02	02	05	0,09
<i>Citrobacter species</i>	02	01	01	04	0,07
<i>Citrobacter freundii</i>	01	00	02	03	0,05
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	01	03	0,05
<i>Salmonella arizonae</i>	01	01	01	03	0,05
<i>Salmonella paratyphi A</i>	01	01	01	02	0,03
<i>Pseudomonas putida</i>	00	01	01	02	0,03
<i>Salmonella paratyphi C</i>	01	00	01	02	0,03
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	02	0,03
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe C	00	00	01	01	0,02
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	00	00	01	01	0,02
Contaminants :					
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	143	119	123	385	7,00
Bacilles Gram Positif (BGP)	54	16	18	88	1,60
Levures	01	01	01	03	0,05

TABLEAU VI : Les espèces bactériennes isolées des LCR au laboratoire de bactériologie- CVD de 2002 à 2004.

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
Total	788	981	1038	2807	100
Résultats négatifs	385	485	522	1392	49,60
Résultats positifs	403	496	516	1415	50,40
Nature des germes :					
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	52	75	87	214	7,67
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	45	68	77	190	6,77
<i>Salmonella</i> spp	15	14	06	35	1,24
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	02	18	09	29	1,03
<i>Escherichia coli</i>	04	05	05	14	0,50
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	00	08	06	14	0,50
<i>Salmonella typhi</i>	03	01	04	08	0,29
<i>Proteus mirabilis</i>	01	04	03	08	0,29
<i>Streptococcus</i> non hémolytique	01	02	04	07	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	03	02	02	07	0,25
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	05	01	01	07	0,25
<i>Streptococcus</i> groupe B	01	01	03	05	0,18
<i>Salmonella paratyphi</i> B	01	01	03	05	0,18
<i>Enterococcus</i> spp	01	02	01	04	0,14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	01	01	02	04	0,14
<i>Pseudomonas putida</i>	02	01	01	04	0,14
<i>Moraxella</i> specie	01	01	01	03	0,11
<i>Klebsiella arizonae</i>	01	01	01	03	0,11
<i>Acinetobacter calvocar</i>	00	01	02	03	0,11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	01	01	02	0,07
<i>Enterobacter agglumera</i>	00	01	01	02	0,07
<i>Citrobacter freundii</i>	00	01	01	02	0,07
<i>Morganella morganii</i>	00	01	01	02	0,07
<i>Salmonella paratyphi</i> A	00	01	00	01	0,036
<i>Enterobacter cloacae</i>	00	00	01	01	0,036
<i>Enterobacter sakasakii</i>	00	00	01	01	0,036
Contaminants :					
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	235	248	252	735	26,18
Bacilles Gram Positif (BGP)	28	34	36	98	3,49
Levures	01	02	04	07	0,25

TABLEAU VII : Résultats des autres liquides biologiques (liquide musculaire, liquide pleural, liquide articulaire, liquide péricardique, ...)

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
Nombre total des prélèvements	47	54	51	152	100
Résultats négatifs	11	15	21	47	30,92
Résultats positifs	36	39	30	105	69,08
Nature des germes :					
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	12	12	39	25,66
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	02	09	04	15	9,87
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	01	02	03	06	3,95
<i>Escherichia coli</i>	00	03	03	06	3,95
<i>Proteus mirabilis</i>	01	02	01	04	2,63
<i>Salmonella typhi</i>	03	01	00	04	2,63
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	01	01	00	02	1,32
<i>Serratia fonticola</i>	01	00	01	02	1,32
<i>Enterococcus spp</i>	00	01	00	01	0,66
<i>Citrobacter freundii</i>	01	00	00	01	0,66
<i>Acinetobacter calvocar</i>	00	00	01	01	0,66
<i>Streptococcus</i> groupe A	01	00	00	01	0,66
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	00	00	01	0,66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00	01	01	0,66
<i>Pseudomonas spp</i>	01	00	00	01	0,66
<i>Serratia odorifera</i>	00	00	01	01	0,66
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	00	00	01	0,66
<i>Citrobacter youngae</i>	01	00	00	01	0,66
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01	00	00	01	0,66
Contaminants :					
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	03	08	03	14	9,21
Bacilles Gram Positif (BGP)	02	00	00	02	1,32
Levures	00	00	00	00	00

TABLEAU X : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques testés, période de 2002

GERME	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques												
	Nbr total	AM -10		CRO-30		C-30		GM-10		SXT		CIP-5	
		Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%
<i>Salmonella Typhi</i>	56	41	73,21	52	93	44	79	34	61	34	61	56	100
<i>Salmonella paratyphi A</i>	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>Salmonella paratyphi B</i>	16	01	6,30	16	100	00	00	08	50	01	6,30	16	100
<i>Salmonella paratyphi C</i>	00	00	00	01	100	01	100	01	100	00	00	01	100

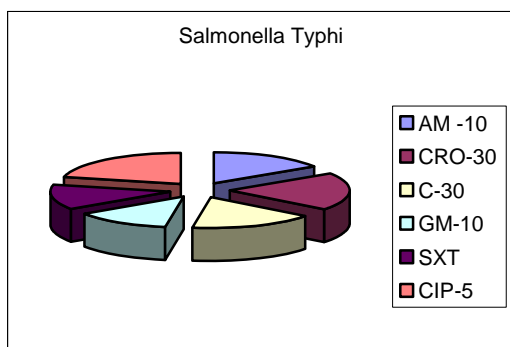


Figure n° 15

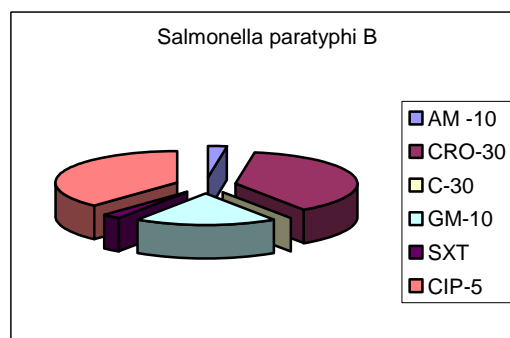


Figure n° 16

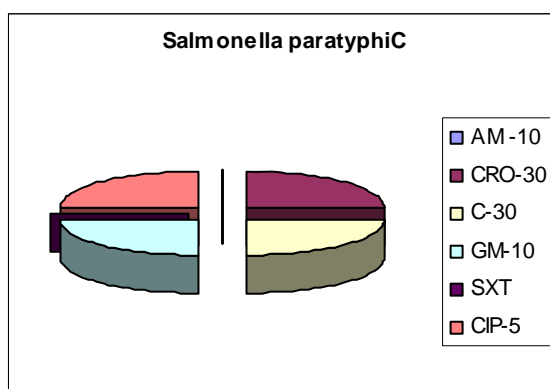


Figure n° 17

TABLEAU XI : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques testés, période de 2003

GERME	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques												
	Nbr total	AM -10		CRO-30		C-30		GM-10		SXT		CIP-5	
		Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%
<i>Salmonella Typhi</i>	20	12	66,70	18	100	18	100	15	83	17	94	18	100
<i>Salmonella paratyphi A</i>	01	00	00	01	100	01	100	01	100	01	100	01	100
<i>Salmonella paratyphi B</i>	11	01	06	11	100	00	00	06	55	00	00	11	100
<i>Salmonella paratyphi C</i>	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

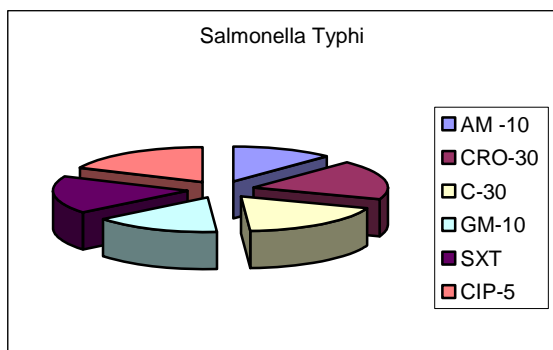


Figure n° 18

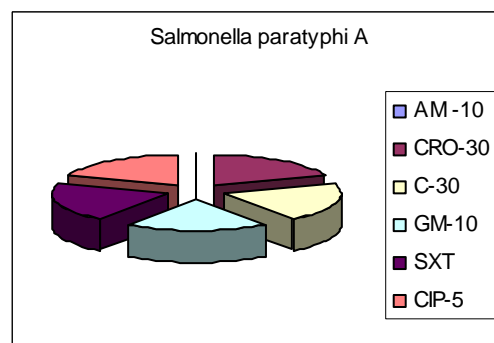


Figure n° 19

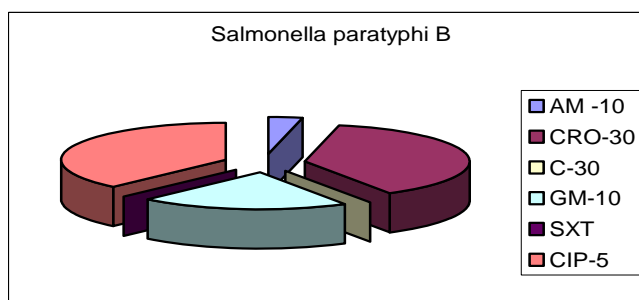


Figure n° 20

TABLEAU XII : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques testés, période de 2004

GERME	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques												
	Nbr total	AM -10		CRO-30		C-30		GM-10		SXT		CIP-5	
		Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%
<i>Salmonella Typhi</i>	13	11	84,61	12	100	11	92	05	39	13	100	13	100
<i>Salmonella paratyphi A</i>	1	00	00	01	100	00	00	01	100	01	100	01	100
<i>Salmonella paratyphi B</i>	5	02	50	01	100	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>Salmonella paratyphi C</i>	1	01	100	00	00	01	100	00	00	00	00	00	00

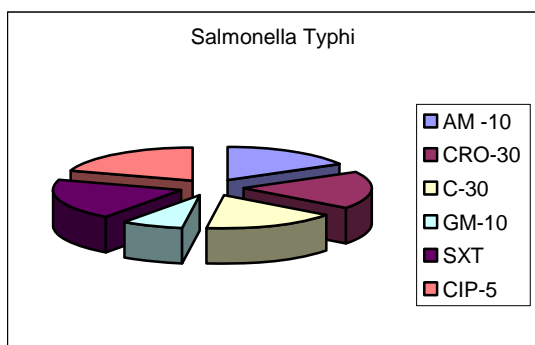


Figure n° 21

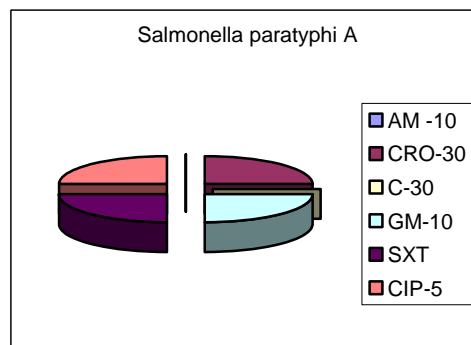


Figure n° 22

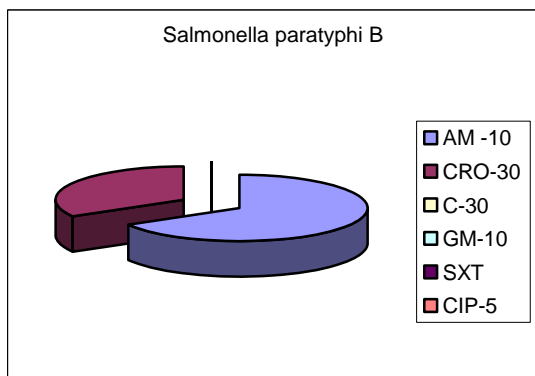


Figure n° 23

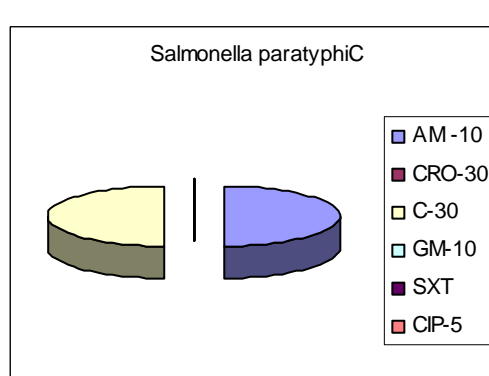


Figure n° 24

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Du point de vue de la méthodologie

L'étude prospective de recherche de diagnostic de laboratoire des infections bactériennes invasives en cours concerne les prélèvements apportés de la pédiatrie sur lesquels des examens bactériologiques sont faits.

Ces prélèvements sont le sang, le liquide céphalo- rachidien et les autres liquides biologiques prélevés chez des enfants souffrant de suspicion d'infections bactériennes invasives (SIBI) comme les méningites, les pneumonies, les septicémies, les otites, les épiglottites, péricardites, les pyomiosites, les infections cutanées profondes, les fièvres typhoïde et paratyphoïde...

Les sangs sont prélevés dans des bouillons nutritifs mis en incubation dans l'appareil Bactec 9050 BD conçu pour la détermination rapide des bactéries, des champignons et d'autres microorganismes présents dans les hémocultures. La surveillance de ces hémocultures est programmée volontairement sur une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques vont de 7 à 10 jours.

L'intervention de l'utilisateur et les manipulations des bouteilles qui consistent à faire la coloration de Gram en fonction de la turbidité observée sur les hémocultures dans la méthode classique, sont minimisées dans la méthode du Bactec. En effet cette dernière est basée sur l'incubation, l'agitation de toutes les cultures et un signal immédiat des positifs par les voyants lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore... tout ce qui concourt à diminuer le risque d'erreur humaine⁷.

Un examen préliminaire est fait sur le liquide céphalo- rachidien, les hémocultures positives et les autres liquides biologiques dont le résultat est porté immédiatement à la connaissance des prescripteurs de la Pédiatrie.

Dans le traitement du LCR, des techniques complémentaires comme les tests d'agglutinations latex, la cytologie (notamment le comptage des globules blancs et des globules rouges) aident aux résultats préliminaires. Il n'a pas été pratiqué d'examens chimiques du LCR (glycorachie, protéinorachie, chlorurorachie).

Les résultats préliminaires et définitifs sont saisis dans un logiciel GDH (pour Global Digital Health) en plus de la saisie dans les registres de travail. Ce logiciel met en réseaux les bureaux de consultation de la pédiatrie, le bureau CVD de la pédiatrie et le laboratoire. Il existe un transfert électronique des données via le système Internet entre l'hôpital, le centre serveur au siège de CVD au CNAM et le Centre pour le Développement des Vaccins à l'Université de Baltimore (Maryland- USA).

Du point de vue des résultats

Etant donné que les *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C*, sont capables d'induire des infections néo-natales gravissimes ; il nous a paru important de rechercher les *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C* dans les suspicions d'infections bactériennes invasives chez les enfants de notre service de pédiatrie. Dans notre étude qui concerne la période de 2002 à 2004 nous avons étudié 5494 prélèvements d'hémocultures soit une moyenne annuelle de 1831. SAMAKE M. en 2003 a travaillé sur 2198 prélèvements de sang. Dans le même temps de 2002 à 2004, 2807 examens cyto-bactériologiques du LCR ont été effectués soit une moyenne annuelle de 935 LCR contre 945 retrouvés chez SAMAKE T. en 2003. De l'ensemble de ces prélèvements il a été isolé de 90 souches *Salmonella Typhi*, 2 souches de *Salmonella paratyphi A*, 33 souches de *Salmonella paratyphi B*, 3 souches de *Salmonella paratyphi C*

Streptococcus pneumoniae et *Haemophilus influenzae* type b qui se retrouvent au 1^{er} plan⁴⁵, Suivi de *Salmonella spp* et de *Salmonella Typhi* représentant la 4^{eme} bactérie mise en cause dans les hémocultures positives..

Au total 1512 hémocultures en bouillon Bactec sont sorties positives soit 27,52 % et 3982 négatives soit 72,48 %. Ce taux de positivité est légèrement supérieur à celui des méthodes d'hémocultures classiques (20 % de positif en moyenne). Parmi ces hémocultures positives, 476 le sont par des contaminants soit 8,66 % et moins de 1 % (0,66 %) donne *in fine* une culture négative sur les milieux solides habituels.

La fréquence des infections à *Salmonella Typhi* a été de 1,41% comparable à celle retrouvée en Cote d'Ivoire en 2000 par Dadié. A et coll soit 0,8 %^{16, 48}.

SOUDE S. G. A. A. sur 156 hémocultures du service de pédiatrie de Cotonou au Bénin en 2004, trouve une fréquence de 74,25 %. Dans l'étude de DIALILOUGOU T.¹⁶ sur les hémocultures au Burkina- Faso effectuée sur 10 années (1986- 1995) ; la fréquence la plus élevée a été observée en pédiatrie soit 43,52 % (28,54 % de *Salmonella Typhi* et 14,98 % d'autres *Salmonella*) ce qui explique que sur 700 souches de *Salmonella* isolées, 459 étaient des *Salmonella Typhi* dans ce service soit 65,57 % de *Salmonella*.

Sur une étude réalisée en milieux pédiatrique dakarois, des auteurs ont montré que *Salmonella Typhi* était le sérotype prédominant, soit 46 % des isolements de *Salmonella* dont la majorité provenait des hémocultures¹⁶.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'enfant constitue chez nous un terrain fragile et la malnutrition avec ces effets cumulatifs face à un environnement infectieux, hostile ne peuvent que favoriser un tel état.

Alors qu'en France, une étude² réalisée en milieux pédiatrique a montré que *Salmonella Typhmurumi* était le plus fréquemment isolé parmi les souches de *Salmonella*.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que depuis¹³ quelques années, les salmonelloses mineures augmentent dans les pays développés avec la

consommation d'œufs crus ou insuffisamment cuits ^{28, 39} et de coquillages ³², tandis que les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes diminuent à cause de l'adoption des mesures hygiéniques.

Si dans les pays développés, le regain d'importance de Salmonelloses mineures contraste avec la diminution régulière des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, dans les pays en développement et plus particulièrement au MALI où les mesures d'hygiène sont encore précaires, les fièvres typhoïde et paratyphoïde sévissent toujours sous forme endémo- épidémique.

CONCLUSION

5.CONCLUSION

Au terme de cette étude nous avons pu évaluer la fréquence d'isolement des principaux germes impliqués dans les suspicions d'infection bactérienne invasive chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'HGT. Au nombre de ces germes, *Salmonella Typhi* et *paratyphi A, B, C* occupent une place prépondérante quand on connaît l'importance majeure et le rôle plus général des principales bactéries des infections nosocomiales dans tous les hôpitaux du monde. La méthodologie moderne des hémocultures avec le Bactec 9050 a permis une approche bactériologique aisée. Sur une période de 3 ans de 2002 à 2004, 5494 hémocultures effectuées ont permis l'identification de 90 souches *Salmonella Typhi*, 2 souches de *Salmonella paratyphi A*, 33 souches de *Salmonella paratyphi B*, 3 souches de *Salmonella paratyphi C*. Les examens cyto-bactériologiques du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) et les autres prélèvements biologiques pour étayer le diagnostic donnent peu soit 11 souches non présentes dans les hémocultures.

L'ensemble de ces examens ont permis d'évaluer le rôle de *Salmonella Typhi* et des formes apparentées dans l'étiologie de ces bactériémies invasives chez les enfants, de définir le profil antibiotique des souches isolées. Nos résultats aident au diagnostic, au choix de l'antibiothérapie et au suivi approprié de l'évolution clinique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **ACHARYA IL, LOWE CU, THAPA R et coll.** Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella Typhi*. N Engl J Med 1987; 317: 1101-04
2. **ASTRUC J, RODIERE M.** Les salmonelloses en pédiatrie. Méd mal inf 1986; 16: 344-9.
3. **AVRIL JL, ANGE B, CAYLA AM.** Les salmonelloses humaines en Ile et Vilaine en 1983. Rev Epidém et Santé Publ 1984 ; 32 : 344-49.
4. **AZELE F.** Bactériologie médicale. 12^è éd La Madeleine : Edition C et D, 1982.
5. **AZELE F.** Bactériologie médicale. 10^è éd: Editions C et R, 1979: p 26-10.
6. **BASTIN R, CHARMOT G, FROTTIER J, WILDE JL.** Maladies infectieuses et parasitaires. 2^è ed. Paris: Flammarion, 1981: 66-73).
7. **BECTON, DICKINSON AND COMPANY. BACTEC 9050 Manuel d'utilisation.** Numéro du document MA-0103. Révision : E Réf 445845. Septembre 2004.
8. **BEN-HASSEN A, BEJAOUI M, LAKHOVA MR, BEN REDJEB S.** profil épidémiologique de la résistance de 153 souches de *Salmonella* (*Salmonella Typhi* exclue) isolées en milieu pédiatrique tunisien de 1985 à 1990. Path Biol 1993 ;41 : 706-12).
9. **BERCHE P, GAILLARD JL, SIMONET M.** Les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion ; 1988 : 77-92 et 572-592.
10. **BOUVET E, HUBERT B.** Epidémiologie des salmonelloses mineures .Rev pra 1992 ; 42 : 2275-8).

11. **CAVALLO JD, MEYRAN M.** les Salmonelloses et leur pathologie : base bactériologique du traitement. *Med mal inf* 1992 ; 22 : 331-9
12. **CAQUET R.** guide pratique des examens de laboratoire. 6^e Editon, Paris 1994.
13. **CISSÉ MF, SOW AI, DIEYE- SARR E et al.** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées en milieux pédiatrique dakarois. *Bull Soc Path Ex* 1993 ; 86 : 43- 7.
14. **CHRISTMANN D, STAUD T, HANSMANN Y.** Manifestations extra-digestives des salmonelloses. . *Méd mal inf* 1992 ; 21 : 413-16.
15. **COULIBALY A.** Contribution à l'étude des troubles hématologiques de la fièvre typhoïde en médecine interne de l'hôpital du Point G de Bamako (à propos de 59 cas). Thèse Med 1988 ; 26.
16. **DALILOUGOU T.** Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées d'hémoculture de 1986- 1995 dans le CHN- YO Burkina-fasso. Thèse- Pharm.
17. **DADIE T, KAROU N, ADOUN A, KETTE et M. DOSSO.** Isolement d'agents pathogènes entériques en Cote d'Ivoire: *Escherichia coli* O157 : H7 et *E coli* enteroagrégant. Institut Pasteur de Cote d'Ivoire, courte note n° 2130. "Bactériologie" mars 2000.
18. **DUTKA-MALEN S, COURVALIN P.** Résistances aux glucopeptides et aux aminosides chez les enterocoques. *Med Mal Inf* 1994; 24: 158164.
19. **EDWARD WH.** *Salmonella* Species « including typhoid fever » In: Mandell GL, Douglas RG, Benett JE. Eds principles and practics of infectious diseases 2^e ed 1985; 53: 17-20

20. **GENTILINI M.** Médecine tropicale 4è éd Paris: Flammarion, 1986: 330-34.
21. **GREVENNA PB, BUENDIA A.** Cambiosen la epidemiologia de la typhoïdea Salud Pub Mex 1973 ; 15 : 839-847
22. **GENDREL D, RICHARD D, LENOBLE M et al.** Interaction Salmonelles- Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*. Presse méd 1986 ; 15 : 689-92.
23. **GUILLEMONT D, CARBON C.** Les salmonelloses : aspects thérapeutiques. Rev Prat 1992 ; 42 : 2286-91.
24. **GLEDEL. J.** Institut Pasteur de LILLE. Cours de microbiologie des viandes et des produits alimentaires du 14 au 25 Septembre 1987. Laboratoire central d'Hygiène Alimentaire.
25. **LECLERC H.** Microbiologie générale. 2^e Edition. 1983, p199- 202.
26. **HIRSCHOWITZ B.** Pyogenic liver abscess. Review with a case report of solidary abscess caused by *Salmonella enteritidis*. Gastroenterology 1952; 21: 291-9.
27. **HOLT P.** Severe *Salmonella* infection in patient with reduced gastric acidity. The practitioner 1985 ; 225 : 1027-30).
28. **HUBERT B.** Surveillance et prévention des salmonelloses en France. *Med Mal Inf* 1992; 22:325- 30.
29. **KEITEL W A, BOND NL, ZAHRADNIK JMB et coll.** Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella Typhi*. Vi capsular polysaccharide vaccines. *Vaccine* 1994; 12: 155-59.

30. **LEMINOR L, RICHARD C.** Institut Pasteur Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries.
31. **LE MINOR L.** Les salmonelles. In : **Leminor L.** Bactériologie medicale Paris : Flammarion, 1992 : 259-74
32. **LE MINOR L, GRIMONT PAD.** Rapport quadriennal du Centre National des *Salmonella* sur l'origine et la répartition en sérotypes des souches isolées en France continentale au cours des années 1980 à 1983. Rev Epidem et Santé Publ 1985; 33: 13- 21.
33. **MALHLE WT, LEVINE MM.** *Salmonella Typhi* infection in children youger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J.* 1993 ; 12 : 627-31)
34. **MARCOU, MEURISSE JJ.** Salmonelloses : aspects thérapeutiques. *Med Mal Inf* 1992 ; 22 : 340-7.
35. **N'DOYE B, DERRIEN JP, GAULTIER Y, VARIERAS G et coll.** Les salmonelloses à l'hôpital principal de Dakar en 1977. *Dakar Méd* 1979 ; 24 : 6-11.
36. **OMS.** Lutte contre les salmonelles : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits. Série de rapports techniques. Genève : 1988 ; n°774.
37. **PECHERE JC, ACAR JF, ARMENGRAND M et al.** Reconnaître, comprendre, traiter les infections. 2è éd Paris : Maloine 1985 : 279-97.
38. **PERELMAN CD et coll.** Infections à *Salmonella*-Salmonelloses. Pédiatrie pratique Paris : Maloine s.a Editeur 1977 : 1103-1111.
39. **POTTER ME, SAINT- LOUIS ME, MORSE DL.** The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. *Juma* 1988; 259: 2103- 73.

40. **ROBBINS JD, ROBBINS JB.** Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide « Vi antigen » of Salmonella Typhi. J Infect Dis 1984; 150: 436-49.
41. **RICHMOND MH. IN: SATTON M, SAOCKMAN GD eds.** Beta-lactamase antibiotics.academic press 1981; 261-73.
42. **SAMAKE M.** Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm, Bamako, 2003.
43. **SAMAKE T.** Pratique de l'examen cyto bactériologique du liquide céphalorachidien au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm, Bamako, 2003.
44. **SIMONIN C, BAYLE A, ZURLINDEN A et al.** Epidemiologie des salmonelles isolées au CHU de Miacon de 1980 à1990. Méd Mal Inf 1992 ; 22 : 674-7.
45. **SOW SO, DIALLO S, CAMPBELL JD, TAPIA MD, KEITA T, KEITA MM,** et al. Burden of ivasive disease caused by *Haemophilus influenzae* Type b in Bamako, Mali: impetus for routine infant immunization with conjugate vaccine. Pediatr Infect Dis J 2005 Jun; 24 (6): 533-7.
46. **Updated by: MICHAEL C. MILONE, M.D., Ph.D.,** Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania MThe causative agent of typhoid fever is the bacterium *Salmonella Typhi*. (Image courtesy of the Centers for Disease Control and Prevention.)Medical Center, Philadelphia, PA.
47. **www.milieux de culture.com/** ©copyringhr Pr guillaume 2004.)
48. **www.pathexo.fr/pages/2000n2.html**

Evaluation du rôle de Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au HGT.

RESUME

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : **DIABATE**

Prénoms : **Cheick Fanta Mady**

Titre de la thèse : Evaluer le rôle de *Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C* en milieu pédiatrique à partir de liquides biologiques prélevés des sites stériles et examinés au laboratoire de l'hôpital Gabriel TOURE

Année universitaire : 2005 - 2006

Ville de soutenance : Bamako

Pays de soutenance : Mali

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie.

Secteurs d'intérêt : Bactériologie, Santé publique, Infectiologie, Pédiatrie.

RESUME

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur l'examen bactériologique des prélèvements effectués chez les enfants de moins de 18 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE. Cette étude s'étend sur la période de février 2002 à décembre 2004.

Elle vise à évaluer le rôle de *Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C* dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Nombre total de prélèvements effectués (hémocultures, LCR, Autres liquides biologiques) : 8453.
- Nombre total d'hémocultures : 5494 soit 64,99% des prélèvements.
- Nombre de flacons Bactec positifs 1512 soit 27,52 %
- Nombre de germes isolés des hémocultures : 1000 soit 66,13 % des flacons positifs et 18,20 % de l'ensemble des prélèvements d'hémocultures.
- Taux de contaminants des hémocultures : 8,66 % soit 476.
- Nombre de flacons Bactec positifs ayant « *in fine* » donné une culture stérile 36 soit 0.66 %.
- Nombre total de LCR : 2807 soit 33,21 % des prélèvements.
- Nombre de cultures de LCR positives 575 soit 20,48 %.
- Nombre de cultures de LCR négatives 1392 soit 49,59 %
- Nombre de germes isolés des LCR : 1415 soit 50,40 %.
- Taux de contaminants des LCR : 29,93 % soit 840.
- Autres liquides biologiques 152 soit 1,79 %.

Fréquence d'isolement des *Salmonella Typhi* et *Salmonella paratyphi A, B, C* :

Des hémocultures :

- 89 *Salmonella Typhi* 1,63 % ;
- 32 *Salmonella paratyphi B* soit 0,58 % ;
- 02 *Salmonella paratyphi A* soit 0,03 % ;
- 02 *Salmonella paratyphi C* soit 0,03 %

Du LCR :

- 01 *Salmonella Typhi* 0,10 % ;
- 01 *Salmonella paratyphi B* soit 0,10 % ;
- 00 *Salmonella paratyphi A* soit 0 % ;
- 00 *Salmonella paratyphi C* soit 0 %.

Mots clés : *Salmonella Typhi et paratyphi A, B, C, Pédiatrie, Prélèvements.*

IDENTIFICATION SHEET

Name : **DIABATE**
First Name : **Cheick Fanta Mady**

THESIS TITLE : Evaluation of the role of the Samonella Typhi and paratyphi A, B, C in paediatric environment from biological liquids removed and examined at the laboratory of the Hospital Gabriel TOURE.

Academic year: 2005- 2006

Place of defense: Bamako

Country of origin: MALI

Deposit place: Library of the Médecine, Pharmacy and Ondo- Stomatology Faculty.

Sectors of Interest: Bacteriology, public Health, Infectiology, Paediatric.

Summary:

It's restrospective study about the bacteriological test of the sampling from children under 18 admitted to the paediatric service of Hospital Gabriel TOURE. This study extends from february 2002 to december 2004.

It aims to evaluate the Salmonella spp's role in paediatric environment the isolated germs of bacteriological tests.

We obtained the following results.

- Total number of samplings perfermed (blood culture, CSF, other biological liquids)= 8453
- Total number of blood culture= 5494 that is to say 64,99% of the samplings
- Number of positive bactec smoll bottles= 1512 that is to say 27,52%

- Number of isolated germs of blood cultures= 1000 that is say 66,13% of positive smoll bottle and 18,20% of the whole blood cultures samplings.
- Rate of germs considered as << contaminant >> of blood cultures= 476 that is to say 8,66%
- Number of positive bactec smoll bottles having << in fine >> given a sterile culture= 36 that is to say 0,66%.
- Total number of CSF= 2807 that is to say 33,21% of the samplings.
- Number of positif CSF culture= 575 that i s to say 20,48%
- Number of Negative CSF culture= 1392 that is to say 49,59%
- Number of isolated germs of CSF= 1415 that is to say 50,40%
- Rate of germs considered as << contanant >> of CSF 29,93%
- Other biolocal liquids= 152 that is to say 1,79%

Salmonella Typhi and *paratyphi A, B, C* isolement rate :

- of blood cultures=

- 89 *Salmonella Typhi* 1,63 % ;
- 32 *Salmonella paratyphi B* soit 0,58 % ;
- 02 *Salmonella paratyphi A* soit 0,03 % ;
- 02 *Salmonella paratyphi C* soit 0,03 %

- of CSF=

- 01 *Salmonella Typhi* 0,10 % ;
- 01 *Salmonella paratyphi B* soit 0,10 % ;
- 00 *Salmonella paratyphi A* soit 0 % ;
- 00 *Salmonella paratyphi C* soit 0 %.

Key words: Samonella Typhi and paratyphi A, B, C, blood cultures, CSF, paediatric, samplings.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ☛ d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- ☛ d'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- ☛ de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;
- ☛ en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

JE LE JURE