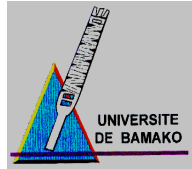


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENTS
SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLICQUE DU MALI
=====
Un Peuple – Un But – Une Foi



Faculté de Médecine Pharmacie et D'odontostomatologie (FMPOS)

Année Universitaire 2010- 2011

Thèse N° /P

TITRE

**GENOTYPES ET PATHOTYPES D'*ESCHERICHIA COLI*
ET AUTRES BACTERIES RESPONSABLES DE
DIARRHEES CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS
A BAMAKO 2008-2010**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 23/04/ 2011 devant la
Faculté de Médecine Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS)
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

par

M. Moustapha SOUMARE

JURY

Président : Professeur : Flabou BOUGOUDOGO

**Membre : Professeur : Samba O SOW
: Docteur : Samba SANGARE**

Codirecteur de thèse : Docteur Boubou TAMBOURA

Directeur de thèse : Professeur : Souleymane DIALLO

DEDICACES

ET

REMERCIEM ENTS

Je dédie ce travail

A DIEU.

Le Tout puissant, le Miséricordieux, le Clément de m'avoir donné la force et le courage de venir à bout de ce travail. Que sa Miséricorde soit sur tous.

A son Prophète Mohamed paix et salut sur Lui.

A mon cher père Feu Youssouf Soumaré.

Très cher papa qui m'apprit à être humaniste et à accepter les gens tels qu'ils sont, vous nous avez toujours montré le chemin du travail bien fait, de l'honneur, du respect de soi même et d'autrui. Votre rigueur dans l'éducation a toujours guidé nos pas. Votre sagesse vos critiques et votre culture d'une famille unie resteront à jamais dans notre mémoire. Tous mes regrets que tu ne sois pas là ce jour, le bon Dieu a voulu ainsi.

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

A mon tonton : Feu Sékou Soumaré.

Vous avez toujours fait preuve de bonne volonté et d'une grande affection dont un neveu 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 soit légère pour ceux qui ne sont plus parmi nous. Que leur âme repose en paix. Amen !

A mes mère Alahina Diarra, Mata Ly Aminata Soumaoro et Oumou Dolo.

Pour vos amours, vos encouragements constants ainsi que vos prières et bénédictions. Ce travail est le modeste témoignage de toute mon affection et de profond respect. Que Dieu le tout puissant vous garde encore très longtemps auprès de nous.

Amen!

A mes Frères et Sœurs : Almami , Bakary, safiatou , Mohamed, Oumar, Moussa, Aminata, Fatoumata, Fati, Drissa, Alou, Boicar, Dramane, Mariam, Youssouf, Awa, Batoma, Mamadou, Boubacar, Sanata, Salimata, Sékou et Adam Konaté.

Très chers, Frères et Soeurs vous m'avez prouvé que le père n'est pas le seul éducateur de la famille, qu'une mère n'est pas seulement celle qui met au monde un enfant, je ne cesserai jamais de vous remercier pour votre sagesse, votre honnêteté et votre grande générosité. Ce travail est également le fruit de votre encouragement et de vos nombreuses prières et bénédictions. Votre dévouement et votre soutien efficace de tous les jours ont permis d'atteindre notre objectif.

Je ne saurai oublier ce lien d'amitié de fraternité et de grande complicité qui nous unis.

Le fait de vous avoir a été une source d'inspiration pour moi et je considère cela comme une chance énorme. Votre soutien inconditionnel m'a accompagné tout au long de ce travail. Je ne peux rassurer que je serai toujours là pour vous. Je vous souhaite plein succès dans tout ce que vous entreprendrez, et courage pour le reste du trajet si épineux. Je suis fier de vous. Que Dieu consolide cette cohésion entre nous.

Puisse ce modeste travail vous donner un début de satisfaction de vos vœux les plus sincères.

A mes tantes.

Très chères tantes, qui m'on prouvé qu'une mère n'est pas seulement celle qui met au monde un enfant, je ne cesserai jamais de vous remercier pour votre sagesse, votre honnêteté et votre grande générosité. Ce travail est également le fruit de votre encouragement et de vos nombreuses prières et bénédictions. Votre dévouement et votre soutien efficace de tous les jours ont permis d'atteindre notre objectif. Puisse ce modeste travail vous donner un début de satisfaction de vos vœux les plus sincères.

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

A mes tontons.

Vous nous avez toujours montré le chemin du travail bien fait, de l'honneur, du respect de soi même et d'autrui. Votre rigueur dans l'éducation a toujours guidé nos pas. Votre sagesse vos critiques et votre culture d'une famille unie resteront à jamais dans notre mémoire. Que l'Eternel vous garde encore longtemps auprès de nous, vos enfants et que vous puissiez profiter du fruit de nos efforts qui sont en réalité les vôtres. Trouvez dans ce modeste travail la récompense de vos nombreux sacrifices.

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

MENTION SPECIALE

**A tout le corps professoral de la Faculté de Médecine de Pharmacie et
d'Odontostomatologie (FMPOS)**

Pour la bonne formation que nous avons reçue de vous.

A tous mes enseignants des écoles fondamentales et secondaires

Pour la bonne formation que nous avons reçue de vous.

Au Directeur Général du CVD : Pr. Mike Lewin

Fondation Bill et Me Linda Gates, à Jim Nataro et à Karen Kotloff

**Au Directeur Général du CNAM, Coordinateur du CVD-Mali : Pr. Samba
O. Sow**

Merci de m'avoir accepté dans votre centre à bras ouverts et de tout l'effort que
vous avez fourni pour le bon déroulement de ce travail.

Merci infiniment cher maître et que Dieu vous prête encore longue vie au
service de tous.

**Au Dr TAMBOURA Boubou : Pharmacien biologiste, chef du laboratoire
CVD-Mali**

Votre simplicité (celle des grand), votre gentillesse et votre sens du partage
sortent hors du commun.

J'admire en vous la cordialité, la disponibilité, mais aussi et surtout la
compétence. Ce travail est le fruit de votre soutien et de vos multitudes conseils.

Qu'Allah vous préserve et vous prête encore longue vie au service de tous.

Au Dr Aliou Touré : Pharmacien

Les mots me manquent pour vous qualifier ; votre courage ; votre esprit de tolérance, votre sens élevé du travail bien fait et votre respect du prochain font de vous une personne exceptionnelle. Recevez ma profonde reconnaissance.

Au Dr Dramane Mallé : Pharmacien

Les mots me manquent pour te qualifier. Ta simplicité, ton amour pour le bon travail, ton dévouement pour la réussite des autres, ta rigueur scientifique, font de toi un homme sans reproche. Que l'Eternel te récompense et qu'il te protège de tous les maux de cette terre Amen.

REMERCIEMENTS

Je remercie le tout puissant **ALLAH** de m avoir donné la chance de réaliser ce travail.

Je remercie tous ceux ou celles qui ont cru en moi, qui m'ont aidé de près ou de loin qu'ils soient vivants ou morts.

*** A mes amis les plus chers :**

Oumar Doumbia, Sidy Tounkara, Alou Dembélé, Diakaria Konaté, Alpha Diko, Oumar Diakité

A mes Amies, pour vôtres soutiens incalculables vous avez été une source d'inspiration pour moi et je considère cela comme une chance énorme, merci pour vos soutiens.

Comme on a l'habitude de le dire: c'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses amis. 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.**

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 aînés du laboratoire de CVD-MALI.**

Drs Aliou Touré, Awa Traoré, Mariam Samaké, Dramane Malla, Mohamed Maïga, Abdoulaye Sangaré, chaka T Diallo et les Internes Oumarou Traoré Mama D Sididé, Kadiatou Kéita.

Les techniciens : Ousmane Diakité, Sidi Diallo, et Mme Coulibaly.

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

*** A tout le personnel du CVD-MALI.**

Merci pour vos encouragements et votre soutien inconditionnel.

*** A l'équipe du CVD-Baltimore.**

A tous, ceux qui ont cultivé en moi le sens profond du travail afin de rendre le travail plus libre et conscient.

A tous les enfants malades du monde entier

Que le tout puissant, le Miséricordieux vous donne la santé. Amen !

HOMMAGE

AUX

MEMBRES

DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

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 la Recherche en Santé Publique

Responsable des cours de bactériologie et virologie à la Faculté de

Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé

Cher Maître, vous nous avez fait honneur en acceptant la réalisation de cette thèse.

En plus de statut de chercheur confirmé, 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.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Pr. Samba O. Sow

Directeur Général du CNAM, Coordinateur du CVD-Mali

Honorable Maître, c'est un grand plaisir et un honneur pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury.

Votre disponibilité et votre grande simplicité ont toujours un grand apport pour la nouvelle génération.

Veillez accepter cher Maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Docteur Samba Adama SANGARE

**Pharmacien chercheur au laboratoire de bactériologie CVD - Mali (Centre pour le Développement des Vaccins - Mali) du CHU Gabriel Touré ;
Assistant en bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).**

Honorable Maître, votre appui a été d'un grand apport dans l'élaboration de ce document ;

Votre simplicité, votre rigueur, votre disponibilité, et votre esprit communicatif font de vous un Maître admiré de tous ;

Nous apprécions à sa juste valeur, l'intérêt avec lequel vous avez accepté de juger cette thèse.

Veillez trouver ici notre profond respect et nos sincères remerciements.

A NOTRE MAITRE ET CO- DIRECTEUR DE THESE

Docteur Boubou TAMBOURA ;

Pharmacien Biologiste,

Chef du laboratoire du CVD-Mali

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 vous 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 surtout votre rigueur scientifique sont des atouts qui nous ont fascinés et dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation.

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

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur Souleymane DIALLO;

Pharmacien biologiste, Colonel des Forces Armées du Mali.

Chef du département médico-technique du CHU Gabriel TOURÉ ;

Directeur du centre d'infectiologie Charles Mérieux de Bamako

Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).

Cher Maître, malgré vos multiples préoccupations vous avez accepté de diriger cette thèse.

Homme de principe votre simplicité, votre rigueur scientifique, votre disponibilité font de vous un maître exemplaire et reconnu de tous ;

Veillez agréer cher Maître l'expression de notre grande admiration et de notre profonde reconnaissance.

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Les maladies diarrhéiques constituent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement.

Selon des chiffres:

- 400 millions de cas par jour dans le monde.
- 20% de décès des enfants de 0 à 4 ans sont liés à la diarrhée,
- 22% des enfants de moins de 1 an meurent de diarrhée avec 14 à 16 épisodes par an et par enfant.

Les diarrhées constituent un motif fréquent de consultation surtout dans les pays où l'hygiène fécale et alimentaire est précaire. Beaucoup de progrès ont été réalisés dans le domaine de la prise en charge et du contrôle de ces maladies diarrhéiques. Si certains épisodes diarrhéiques restent sans lendemain, d'autres sont en revanche à l'origine de redoutables épidémies. Ces épidémies explosives sont en rapport avec de nombreux facteurs :

- La démographie dans certains pays,
- La récession économique,
- Les catastrophes naturelles

La liste des agents pathogènes ne cesse de s'allonger au fil des années. Le premier agent bactérien épidémiogène est *Vibrio cholerae* El tor. L'Afrique fut atteinte en 1970, depuis il est endémo-épidémique en Afrique. Il est très difficile de connaître le nombre exact de cas de cholera.

Mais depuis 1992, on note une augmentation générale des cas.

Le second agent à l'origine des épidémies est *Shigella dysenteriae* serotypes 1 ou bacille de Shiga. IL est responsable de plus de 100.000 cas d'infections intestinales dans le monde par an. *Salmonella Typhi* et *Paratyphi A, B, C* restent l'apanage des pays en voie de développement.

D'autres agents bactériens sont venus s'ajouter au fil des années :

- *Campylobacter* chez les enfants,

- *Aeromonas*

Les *Escherichia coli* entéropathogènes sont des agents fréquents dans les gastroentérites, 68% chez les enfants.

Des épidémies à *Escherichia coli* commencent à être rapportées en restauration collective. [2, 3, 9,11]

Le développement des techniques de laboratoire, notamment la biologie moléculaire par la méthode de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) (Polymerase Chain Reaction) a permis une meilleure identification des *Escherichia coli* pathogènes responsables de ces diarrhées.

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1.1.Objectifs :

1.1.1Objectif général :étudier les souches d'*Escherichia coli* responsables des diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans.

1.1.2.Objectifs spécifiques :

- Identifier les bacteries responsables des diarrhées chez les enfants.
- Déterminer les serotypes et les pathotypes d'*Escherichia coli* par PCR.
- Déterminer les pathotypes d'*Escherichia coli* prédominants dans les épisodes de diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans.
- Répartition des pathotypes d'*Escherichia coli* en fonction de la tranche d' âge, du sexe, et de la saisonnalité.
- Aider et orienter les prescripteurs dans le diagnostic des diarrhées chez les jeunes enfants.

GENERALITES

2. GENERALITES :

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud qu'ils colonisent dès les premières heures après la naissance. Ils constituent l'espèce dominante de la flore aérobie.

Les *Escherichia coli* n'existent pas normalement dans l'eau et le sol, leur présence est un indicateur de contamination fécale.

Les *Escherichia coli* sont des bacilles gram négatifs, mobiles, non sporulés, aérobies facultatifs, cultivent sur milieu ordinaire (on utilise des géloses Lactoses, contenant le pourpre de bromocresol qui vire au violet en cas de fermentation du lactose), glucose positif, catalase positif, oxydase négatif, nitrate réductase négatif. [23].

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des entérobactéries.

Cette famille se compose des bacilles gram négatifs, mobiles ou immobiles, non sporulés, cultivés sur milieu ordinaire à base d'extrait de viande, aéro-anaérofautatifs, glucose positif avec ou sans production de gaz. Cette famille présente la composition antigénique suivante : [23]

- Antigène de paroi : endotoxine
- Antigène de surface : Ag vi dans l'enveloppe, Ag k dans la capsule,
- Antigène flagellaire : Ag H. [13], [14], [16]

La famille des entérobactéries comprend 14 genres dont le genre *Escherichia*

Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* et une cinquième très rare isolée par Blattes d'où le nom d' *Escherichia blattae*. Ces espèces sont bien différenciables sur la base des résultats des hybridations ADN/ADN et par des caractères phénotypiques particuliers comme illustrés dans le tableau ci- après

Tableau I : Caractères biochimiques des différentes espèces d'*Escherichia* [7], [8], [15]

Caractères biochimiques	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
indole	+	+	-	+
LDC	[+]	-	+	+
ODC	D	+	-	+
TTR	-	+	-	-
Bêta xylonidase	-	D	+	-
Bêta glucoronidase	[+]	-	-	-
sorbitol	+	-	-	-
malonate	-	-	+	-
adonitol	-	-	-	-
Pigment jaune non diffusible	-	+	D	-

LDC : lysine décarboxylase

ODC : ornithine décarboxylase

d : différents types biochimiques

+ : positif entre 1 à 2 jours

[+] : positif en 2 jours

- : négatif

TTR : Tetrathionate réductase

La souche K12 *Escherichia coli* a servi de matériel à la plupart des études génétiques faites dans cette espèce : la généalogie des mutants, la carte chromosomique, la traduction et la conjugaison. [19], [21]

Les *Escherichia coli* peuvent héberger des plasmides, certains codent pour les antigènes d'adhésion, d'autres codent pour des caractères biochimiques inhabituels chez les *Escherichia coli* ou pour des résistances aux antibiotiques. [5], [6], [18].

Il existe quelques variétés pathogènes qui peuvent être à l'origine des diarrhées. L'analyse des facteurs de virulence a permis de reconnaître six catégories *Escherichia coli* pathogènes agissant par des mécanismes différents.

2.1.-Les *Escherichia coli* enterotoxinogènes : ETEC (Enterotoxigenic E.coli)

Les ETEC sont transmis par l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés. Ils sont la principale cause de diarrhée chez l'enfant surtout avant l'âge de cinq ans dans les pays en voie de développement. Ces bactéries ingérées adhèrent aux anthérocytes par un facteur d'attachement et secrètent une enterotoxine (une toxine thermolabile LT et une toxine thermostable ST) responsable d'une diarrhée aqueuse s'accompagnant de nausées et vomissements, douleurs abdominales, parfois de fièvre et de malaise générale.

2-2-Les *Escherichia coli* enteropathogènes : EPEC (E.coli Enteric)

Les EPEC sont des bactéries responsables de diarrhée chez l'enfant. Ils peuvent être responsables d'épidémies dans les collectivités en milieu néonatal, favorisées par le manque d'hygiène. La maladie est transmise entre humain. La diarrhée peut être sévère et prolongée. En conséquence les selles sont aqueuses et accompagnées de mucus, de fièvre, de vomissement.

2-3-Les *Escherichia coli* entero-invasifs : EIEC (Entero-invasive E.coli)

Pour leurs caractères biochimiques et antigéniques, ils sont intermédiaires entre les *Escherichia coli* classiques et les *Shigella*. Ils produisent une exotoxine similaire à celle des *Shigella*.

Ces bactéries causent un syndrome dysentérique et le mécanisme du pouvoir pathogène est identique à celui des *Shigella* : pénétration dans les cellules épithéliales, déclenchement d'une importante réaction inflammatoire locale pouvant aboutir à la formation d'abcès et d'ulcération au niveau du colon. La symptomatique est la même que celle de la dysenterie : fièvre, diarrhée avec sang, mucus et pus dans les matières fécales. L'épidémiologie est la même que celle des *Shigella* de même que la thérapeutique avec les antibiotiques.

2-4-Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : EHEC

(E.coli Enterohaemorrhagic)

Ce sont les agents de la colite hémorragique, syndrome qui apparaît brutalement sous forme de cas isolé ou groupé après absorption d'aliments contaminés. Il est caractérisé par de violentes crampes abdominales douloureuses, une diarrhée aqueuse suivie d'une diarrhée hémorragique sans pus, peu ou pas de fièvre. Les EHEC ne produisent ni LT ni ST mais un puissant cytotoxine thermolabile.

2-5-les *Escherichia coli* entéroadhérants : EAEC

(E.coli Enteroadherants)

Leurs caractères sont voisins de celle des EPEC. Ils provoquent des diarrhées modérées chez les enfants et le voyageur en milieu tropical.

Les *Escherichia coli* sont également le plus souvent en cause dans les infections fréquentes de l'arbre urinaire et dans celle plus rare de la vésicule biliaire. Ils peuvent causer des infections au niveau de la vessie (infection basse) ou au niveau des reins (infection haute). Ils sont également responsables des méningites et septicémies survenant chez le nourrisson durant le premier mois de la vie. L'incidence des méningites à *Escherichia coli* est de 0.5% des

naissances et c'est *Escherichia coli* qui est responsable dans 40 à 80 % des cas suivant les publications. Ces méningites causent un taux élevé de mortalité et laissent des séquelles chez le survivant. Les résultats du traitement antibiotique sont souvent décevants. [20], [22], [17]

2-6- *Escherichia coli* à adhésion diffuse : (DAEC) *Escherichia coli* adherence to diffuse

Sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture (Benz et Schmidt, 1992 ; Cookson et Nataro, 1996).

2-7- génotypes et pathotypes d'Escherichia coli :

Les *Escherichia coli* sont des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae qui vivent essentiellement comme bactéries commensales dans les viscères. Les *E. coli* provoquent une multitude de maladies diarrhéiques chez l'homme dans les pays en voie de développement. Les *E. coli* sont divisés en six groupes importants : ETEC, EPEC, EAEC, EHEC, DAEC, EIEC. Les diarrhées à *E. coli* s'ensuivent le plus souvent d'ETEC, EPEC, ou EAEC, qui sont détectés par la méthode de diagnostic de biologie moléculaire mettant en évidence la présence des gènes choisis sur le chromosome ou codé par un plasmide dans les trois pathotypes dominants : L'eltB et estA responsables de la production de LT et ST sont dues aux ETEC ; Eae et bfpA sont des gènes d'attachement d'EPEC, et le gène eae est aussi retrouvé dans la plupart des virulences EHEC ; Le gène aatA du plasmide pAA et le gène aaiC sont typiques d'EAEC. [31,32,33,34,35,36].

METHODOLOGIE

3. METHODOLOGIE :

3.1 Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) au Mali et ses activités :

3.1.1. Situation géographique

Le centre est Situé à Djicoroni Para dans l'enceinte du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM) de Bamako (Ex Institut Marchoux) sous la tutelle du ministère de la santé.

Il a été créé en 2002 dans le cadre de la coopération entre le ministère de la santé du Mali et le centre pour le développement des vaccins de l'Université de Maryland à Baltimore aux Etats-Unis.

Il a comme objectif la surveillance des maladies à potentiel épidémique et endémique.

3.2. Contrôle de qualité : QC

Le QC est l'ensemble des activités de vérification et de contrôle de la collecte des données jusqu'aux résultats.

Un contrôle de qualité doit être effectué à toutes les étapes de la manipulation des données pour assurer la fiabilité et le traitement approprié de toutes les données.

Ce contrôle de qualité porte sur les appareils, les milieux de culture, les réactifs, les techniques, et le report des résultats.

Pour les appareils, une prise de température doit être effectuée et notée sur la fiche tous les jours. Pour chaque appareil, la température est indiquée sur un écran.

Pour les réactifs, il est nécessaire de vérifier la date de fabrication du produit et sa date d'expiration, de les tester, de maintenir une température convenable de conservation pour chaque produit.

Pour les milieux de culture, effectuer un test de stérilité et un test de positivité.

Pour les tests de positivité, les milieux de culture sont testés avec des souches de référence. Ces souches sont celles de American Type Culture Collection (ATCC) et respectent les normes des sociétés savantes de microbiologie.

La qualité du milieu se traduit par :

- Stérilité,
- Croissance sélective,
- Bonne conservation.

Nos milieux de culture suivants sont testés :

3.2.1. Tableau II : Gélose Mac conkey

organismes	Conditions de croissance	Observation	Stérilité
<i>Escherichia coli</i>	Aérobic 24h 35° à 37°C	Colonies roses	Pas de croissance

3-2-2-Tableau III : Gélose SS

organismes	Conditions de croissance	Observation	Stérilité
Salmonella Thyphi	Aérobic 24h 35° à 37°C	Colonies incolores	Pas de croissance

3-2-3-Tableau IV : Gélose XLD

organismes	Conditions de croissance	Observation	Stérilité
<i>Shigella</i>	Aérobic 24h 35° à 37°C	Croissance	Pas de croissance

3-2-4-Tableau V : Gélose Müller Hinton

organismes	Condition de croissance	Observation	Stérilité
<i>Escherichia coli</i>	Aérobic 24h 35° à 37°C	Croissance	Pas de croissance

3-2-5-Tableau VI : Gélose UREA

organismes	Condition de croissance	Observation	Stérilité
Bacille Gram négatif	Aérobic 24h 35° à 37°C	Coloration rouge	Coloration intacte

3-2-6-Tableau VII : Gélose MIO

organismes	Condition de croissance	Observation	Stérilité
<i>Escherichia coli</i>	Aérobic 24h 35° à 37°C	Turbidité et croissance	Aucun changement

3-2-7-Tableau VIII : Gélose TSA

organismes	Condition	Observation	Stérilité
<i>Escherichia coli</i>	Aérobic 24h 35° à 37°C	Croissance	Pas de croissance

3-2-8-Tableau IX : Gélose TSI

organismes	Condition de croissance	Observation	Stérilité
<i>Escherichia coli</i>	Aérobic 24h 35 à 37C	Croissance avec gaz	Pas de croissance

3-2-9-Tableau X : Bouillon BGN

Organismes	Condition de croissance	Observation	Stérilité
<i>Shigella</i>	Aérobie 24h 35° à 37°C	Turbidité	Pas de croissance

3.2.10.-Test d'oxydase :

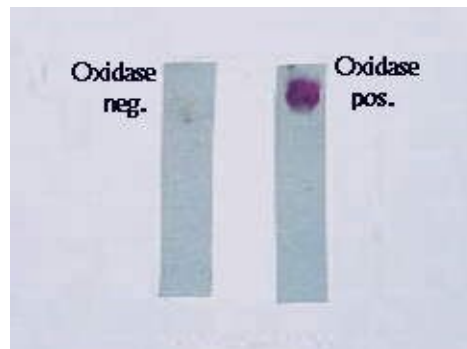


Figure : 1

- 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 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.

Les bactéries oxydase négatives les plus connues sont les Enterobacteriaceae.

3.2.11. Test de catalase :

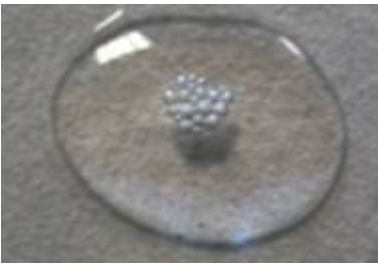
Aspect du test positif	Techniques	Caractères recherchés	Résultats
	<ul style="list-style-type: none"> • Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes, • A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien • Observer immédiatement. • Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose, déposer une goutte d'eau oxygénée • Observer immédiatement. 	<p>- La catalase</p>	<p>- Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase +</p> <p>- Pas de bulles : catalase -</p>

Figure : 2

3.3. Echantillonnage :

3.3.1. Critères de sélection :

Critères d'inclusion :

Pour être inclu dans l'étude, l'enfant doit répondre aux critères suivants :

- Etre dans la zone de SSD (Système de Surveillance Démographique),
- Etre âgé de 0 à 59 mois,
- Avoir 3 selles liquidiennes anormales ou plus durant les 24 dernières heures,
- Avoir une diarrhée dans les 7 jours précédents,
- Avoir au moins un des signes suivants de diarrhée modérée ou sévère :
 - Yeux enfoncés, plus que normal,
 - Perte de l'élasticité de la peau ou pli cutané
 - Administration ou prescription des réhydrations intraveineuses
 - Dysenterie,
 - Hospitalisé avec diarrhée ou dysenterie.
- Avoir le consentement du parent

Critères de non inclusion :

Ne sont pas inclus :

- Si l'enfant est présenté en dehors des heures de travail,
- Si l'enfant est incapable de produire l'échantillon de selles adéquates (10 grammes avec un minimum de 3 grammes) jusqu'à 4 heures après l'admission,
- Si le quota de 14 jours est accompli,
- Si l'enfant décède avant l'inclusion,
- Si l'enfant est très malade,
- Si le parent/gardien de l'enfant est trop occupé, ou n'adhère pas le consentement.

3.3.2 Collecte des selles : _____

Notre étude s'est déroulée en commune I et IV et HGT (commune III)

Nos échantillons de selles sont collectés chez les enfants de 0 à 5 ans présentant des épisodes de diarrhée admis dans les centres de santé communautaire (CSCOM) de Banconi à ASSACO BA, ASSACO DJAN, ASSACO SADJA, au CSCOM de la commune I à korofina, de Djicoroni à ASSACO Djeneke, à ASSACO Djip, à l'infirmerie du camp para, au CSCOM de la commune IV et à l'Hôpital Gabriel Touré de Bamako.

Les échantillons de selles sont acheminés au laboratoire de microbiologie du CVD au CNAM pour l'identification. Les germes recherchés sont : *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Sapovirus*, *Norovirus*, *Adénovirus*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia* et le *Cryptosporidium*.

3.3.3-PROCEDURES DE TRAITEMENT DES SELLES :

3.3.3.1. Examen morphologique des selles :

L'échantillon de selles reçu par le personnel du laboratoire est soumis à un contrôle :

- Si l'échantillon arrive à moins de 18 heures après l'émission du selle,
- Si l'échantillon est transporté dans ces milieux de transport : un écouvillon de selle dans CB un autre dans BGS et une quantité de selles d'au moins 3 grammes dans le pot.
- Si la température de transport de l'échantillon est respectée : 4° C,
- Si l'échantillon porte le numéro d'identification du patient et la date du prélèvement,
- Si l'échantillon est accompagné par son dossier de référence.

3.3.3.2. Ensemencement :

Cinq milieux de culture sont ensemencés :

- Mac conkey pour la recherche d'*Escherichia coli* ;
- XLD pour la recherche de *Shigella* et *Salmonella* ;
- TCBS pour la recherche de *Vibrio* ;
- Ryan pour la recherche d' *Aeromonas* ;
- CBA pour la recherche de *Campylobacter*.

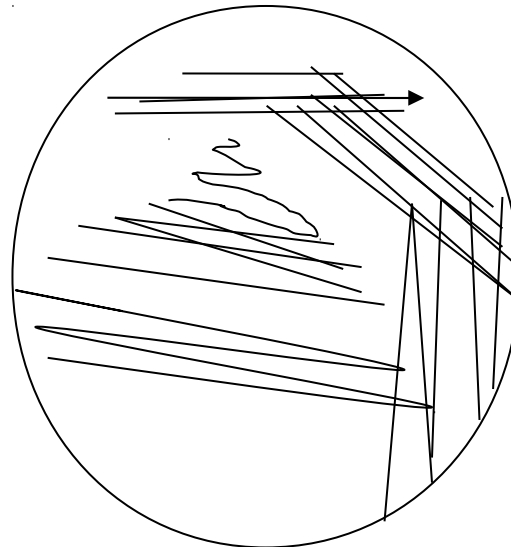
Les écouvillons provenant des milieux de transport BGS et CB sont ensemencées sur les milieux de culture :

Technique d'ensemencement :

Pour ensemençer :

- Nous identifions tous les milieux de culture par le numéro (ID) du patient et la date du jour,
- Nous ensemençons un milieu XLD et un milieu Mac conkey avec l'écouvillon de selle contenu dans le BGS,
- Nous ensemençons un autre milieu XLD, Mac conkey, TCBS, Ryan, et CBA avec l'écouvillon de selle contenu dans le Cary Blair,
- Nous identifions un milieu APW avec le numéro du patient et la date du jour puis introduire l'écouvillon de selle provenant du Cary Blaire,
- Nous ensemençons tous les milieux suivant quatre cadrant et en changeant la face de l'anse d'un cadrant à l'autre,
- Nous portons l'ensemble des milieux ensemencés sauf le CBA à l'incubation entre 35°C et 37°C pendant 18 à 24 heures à CO₂ ou sans CO₂.
- Le milieu CBA est incubé dans un incubateur de 42°C dans un jar avec générateur de dioxyde de carbone pendant 48 heures.

Figure : 3 Modèle d'étalage sur boîtes (4 quadrant)



3.3.3.3. ALIQUOT :

Identifier quatre tubes à eppendorf de 2ml et Aliquotes dans chacun 1 à 2 gramme de selles.

- Un tube pour un test viral,
- Un tube pour la recherche de parasites,
- Les deux autres tubes sont conservés comme archives (0,5 gramme).

3.4. IDENTIFICATION :

3.4.1. Technique : après 24 heures d'incubation :

3.4.1.1. Isolement de *Salmonella* et *Shigella* :

Les colonies non lactoses fermentaires (NLF) sont celles concernées pour la recherche de *Salmonella* et *Shigella*.

- Sur Mac Conkey :

- Les colonies NLF apparaissent claires ou transparentes,
- Reisolier les colonies suspectes selon la morphologie et l'apparence sur les milieux TSI, UREA, MIO, LDC puis incuber a 37°C pendant 18 à 24 heures

- Sur XLD

Les colonies NLF apparaissent soit transparentes, soit rouges ou roses avec un centre noir.

Reisoler ces colonies sur les milieux TSI, LDC, UREA, et MIO et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

3.4.1.2. Isolement de *Vibrio*

Examiner le milieu TCBS

- Observer la croissance
- Les colonies jaunes, verdâtres sont reisolées sur TSA et portées à l'incubation pendant 24h
- En cas d'absence de croissance, pendant 24h reincuber encore le milieu pendant 24h.
- Ensemencer un autre milieu TCBS avec l'écouvillon contenu dans l'APW et incuber pendant 18 à 24h.

3.4.1.3. Isolement d'*Aeromonas*

- Observer le milieu Ryan
- Les colonies vertes sombres sont reisolées sur TSA et incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

3.4.1.4. Isolement *Escherichia coli*

- Sur Mac Conkey
- Observer les colonies lactoses fermentaires (LF) d'apparence violette,
- Prendre 3 colonies morphologiquement différentes,
- Ensemencer un milieu MIO et porter à l'incubation pour un future test à l'indole,
- Ensemencer un milieu TSA pour la souche.

3.4.2. Technique d'identification : Lecture des milieux : 48 heures après

- Mac Conkey et XLD :
- Lire les milieux incubés : TSI, UREA, LDC et MOI,
- Ne pas travailler sur les Ureases positives,
- Les colonies suspectées ***Shigella*** se présentent :
 - Fermentation Alcaline Acide K/A au TSI
 - Sans gaz
 - Sans H₂S
 - UREA négatif
 - LDC négatif
 - Non motile
 - Ornithine négatif
 - Indole négatif
- Les colonies suspectées ***Salmonella*** se présentent :
 - Fermentation Alcaline Acide K/A au TSI
 - Avec ou sans gaz
 - H₂S positif
 - Motile
 - Indole négatif
 - Ornithine positif
 - LDC positif excepte le paratyphi A
- Les colonies qui ne présentent pas ces critères sont éliminées.
- Si les milieux reincubés ne présentent aucune colonie NLF, l'échantillon est considéré négatif au ***salmonella*** et ***Shigella***.
- Les colonies LFensemencées sur TSA sont testées à l'indole
- Si le test à l'indole est positif, il s'agit d'***Escherichia coli***
- Prendre trois colonies suspectées selon la morphologie et l'apparence et tester à la P.C.R.

- TCBS :

Les colonies vertes sur TSA sont soumises à un test d'oxydase

- Si l'oxydase est négative, les colonies sont jugées négatives au *Vibrio*
- Si l'oxydase est positive, inoculer le bouillon Na Cl a 0%, 6% et 8%
- Lecture des bouillons Na Cl :
- Les colonies jaunes sur TCBS se développent avec une turbidité à 0% et non à 8%, elles sont suspectées *Vibrio cholerae* et sont confirmés par un test d'agglutination par les serotypes O1 et O139.
- Si le *Vibrio cholerae* agglutine avec le serotype O1, il faut faire les agglutinations avec les sous-types INABA et OGAWA

NB : 50% des *Vibrio cholerae* croient à 6% Na Cl

- Les colonies vertes sur TCBS qui croient à 6%, à 8% et non à 0% sont suspectées *vibrio parahæmolyticus*
- Faire la souche et conserver à -80°C.

- RYAN :

- Faire le test d'oxydase et de catalase
- Si l'oxydase est négative, et catalase positive ou négative, les colonies sont jugées négatives
- Si les tests sont positifs, passer à l'inoculation aux différentes concentrations de Na Cl puis au test de sensibilité au disque O/129
- S'il y a croissance à 0% et non à 6% et à 8% et résistante au disque O/129, il s'agit d'*Aeromonas spp*
- Faire la souche et conserver à -80°C

- CBA :

Observer les colonies suivantes :

- Jaunâtres ou violettes
- Bord étendu et régulier
- Mucoïde
- Etendues le long de l'ensemencement
- Rondes et convexes
- Faire le test d'oxydase et de catalase
- Si les tests sont positifs :
- Faire le test au sodium hippurique et une coloration de Gram
- Observer la lame au microscope
- Si l'observation montre des bacilles Gram négatifs incurvés ou en forme de

S, deux cas peuvent se présenter :

- Si le test au l'hippurate sodium est positif, il s'agit du *Campylobacter jejuni*

- Si le test est négatif, c'est le *Campylobacter spp.*

3.4.3. Technique : 72 heures après

Confirmation :

- *Salmonella* :

Les *Salmonella* sont agglutinées au polyvalent O et Vi suivant les instructions du laboratoire du fabricant.

- *Shigella* :

Agglutination au serotypes A, B, C et D.

Faire la souche et conserver dans un milieu de TSB (trypticase soy broth) + 15% de glycérol à -80°C.

3.5. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE : PCR

La polymérase Chaîne réaction est une technique de réplication ciblée in vitro.

L'objectif de la PCR est d'obtenir un grand nombre de copies de gène par une série d'amplification d'un brin d'ADN en présence d'un excès d'amorces, de nucléotides et d'une ADN polymérase.

3.5.1. EXTRACTION DE L'ADN :

- Nous identifions un tube eppendorf de 1.5ml
- Nous introduisons 200µl d'eau distillée
- Nous suspendons 3 colonies bactériennes dans le tube
- L'ensemble est chauffé dans l'eau dans une microonde pendant 20min pour la lyse des cellules
- Nous centrifugeons à 10000 tours pendant 2min et récupérer le surnageant qui constitue l'ADN

3.5.2. PREPARATION DU MELANGE MIXTE :

Le mélange est préparé en fonction du nombre des échantillons. Elle consiste à faire le mélange des réactifs suivants : Buffer (tampon : 2mM : MgCl₂), eau, dNTP, amorces.

Pour une réaction :

Tableau XI : mélange mixte

REACTIFS	SIMPLE REACTION	Total volume
Buffer (2mM MgCl ₂)	2.5ul	
H ₂ O	7.37ul	
dNTP (1.25 mM)	2ul	
LT forward	0.4ul	
LT reverse	0.4ul	
ST forward	0.4ul	
ST reverse	0.4ul	
bfpA forward	0.4ul	
bfpA reverse	0.4ul	
CVD 432 forward	0.4ul	
CVD 432 reverse	0.4ul	
aaiC forward	0.4ul	
aaiC reverse	0.4ul	
eae forward	0.44ul	
eae reverse	0.44ul	
Taq polymérase	0.25ul	

Volume total du mélange mixte par réaction : 17 ul

Volume total par réaction : **17 ul** du mélange mixte

+

Volume d'ADN : **3 ul** ADN

Volume total par réaction : **20ul**

3.5.3. REACTION DE POLYMERISATION (D'AMPLIFICATION) :

La réaction de polymérisation se déroule dans un petit tube lui-même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur.

Le thermocycleur est programmé comme suit :

- A 94°C

- A 55°C

- A 72°C

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation ou extension des amorces.

3.5.3.1. Dénaturation :

A cette température de 94°C, les liaisons faibles qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

3.5.3.2. Hybridation : 55°C

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe d'appariement des bases complémentaires.

Par mouvement, les amorces arrivent à trouver la partie complémentaire à leur séquence au niveau des simples brins. La synthèse du nouveau brin commence à partir de la dernière base de l'amorce sous l'action de l'ADN polymérase.

3.5.3.3. Elongation : 72°C

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des desoxyribonucleotides présents dans le mélange mixte en large excès.

Ces polymérases ne sont pas dénaturées par la chaleur. La plus connue est la Taq DNA polymérase. [24]

Les Taq DNA polymérase est une enzyme qui synthétise l'ADN de l'extrémité **5'** vers l'extrémité **3'**. Elle est extraite des bactéries vivant naturellement à des températures élevées comme sources hydrothermales du fond des océans.



Figure : 4 : le thermocycleurs pour PCR

3.6. ELECTROPHORESE SUR GEL d'AGAROSE :

L'électrophorèse est une technique de séparation des molécules suivant leur charge et leur poids moléculaire sous l'influence d'un courant électrique. Les molécules biologiques possèdent des groupements ionisables et suivant un Ph existant en solution comme des molécules électriquement chargées. Selon la nature de la charge les molécules migreront soit vers la cathode ou l'anode. [1,4]

Préparation du gel dans notre cas précis :

- Dissoudre 2g d'agarose dans 100ml de TAE Buffer à 1/50
- Homogénéiser
- Chauffer pendant 3min
- Ajouter 3ul/100ml de bromure d'ethidium
- Couler le gel dans le matériel en présence des brèches permettant d'obtenir des puits ménages
- Laisser le gel se solidifier.

Migration :

- Déposer le gel solidifié dans la cuve pour électrophorèse contenant de TAE Buffer à 1/50
- Déposer 2ul de bleu de méthylène sur papier parafilm pour chaque échantillon
- Mélanger le marqueur 1KB au bleu et déposer 4ul ou du 100bp et déposer 6 ul dans le premier puits.

Le marqueur 1KB, 100bp permet de déterminer la taille de migration des différents échantillons testés.

- Déposer les contrôles négatif et positif
- Pour chaque échantillon, mélanger 2ul d'enzyme dilue à 10ul de produit PCR et déposer dans un puits.
- Connecter la plaque électrophorèse aux pôles d'un générateur de courant électrique.
- La migration doit s'effectuer du pôle négatif vers le pôle positif.

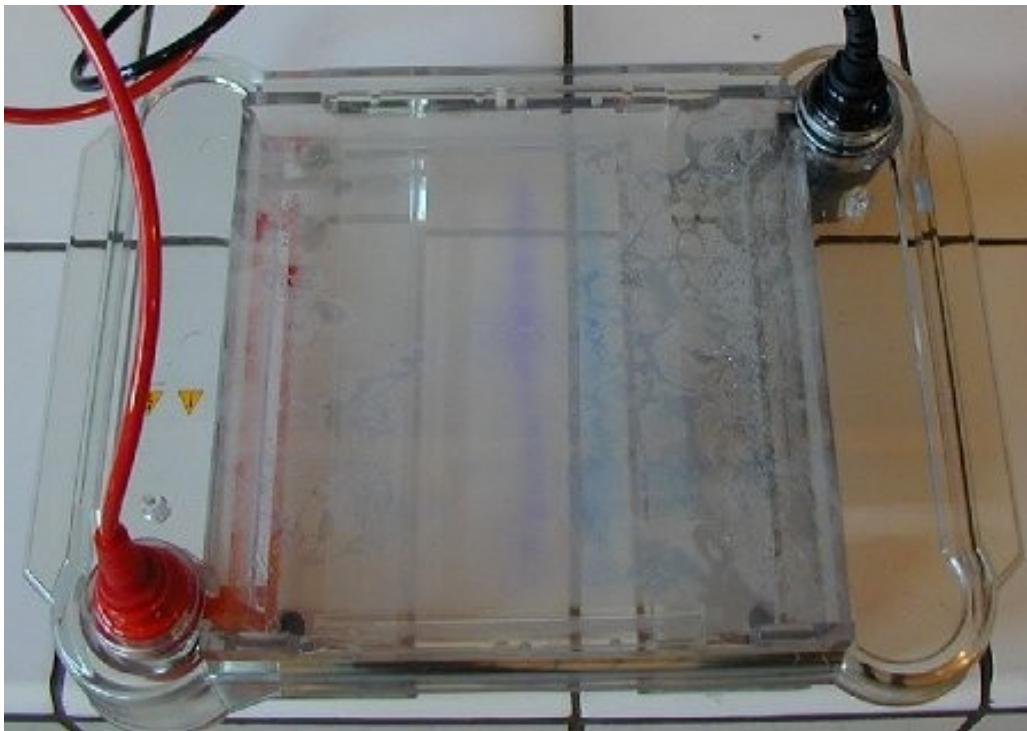


Figure : 5 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 15 x 10 cm (15 puits)
Noter la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode

3.7. LECTURE :

Elle se fait dans une chambre obscure, à l'aide d'une lampe UV les gènes sont identifiés suivant leur taille de migration sur le gel comparée à la taille des bandes du marqueur.

Ainsi on identifie les gènes suivants :

Tableau XII : Les différents pathotypes et génotype d'*Escherichia coli*

Germes	gènes	Gènes testés	Taille en KB
EPEC	eltB (LT)	H 10407	508
EPEC	est (ST)	H 10407	147
EPEC	bfpA	2348/69	300
EPEC	Eae	2348/69	881
EAEC	aatA	042	650
EAEC	aaiC	042	215

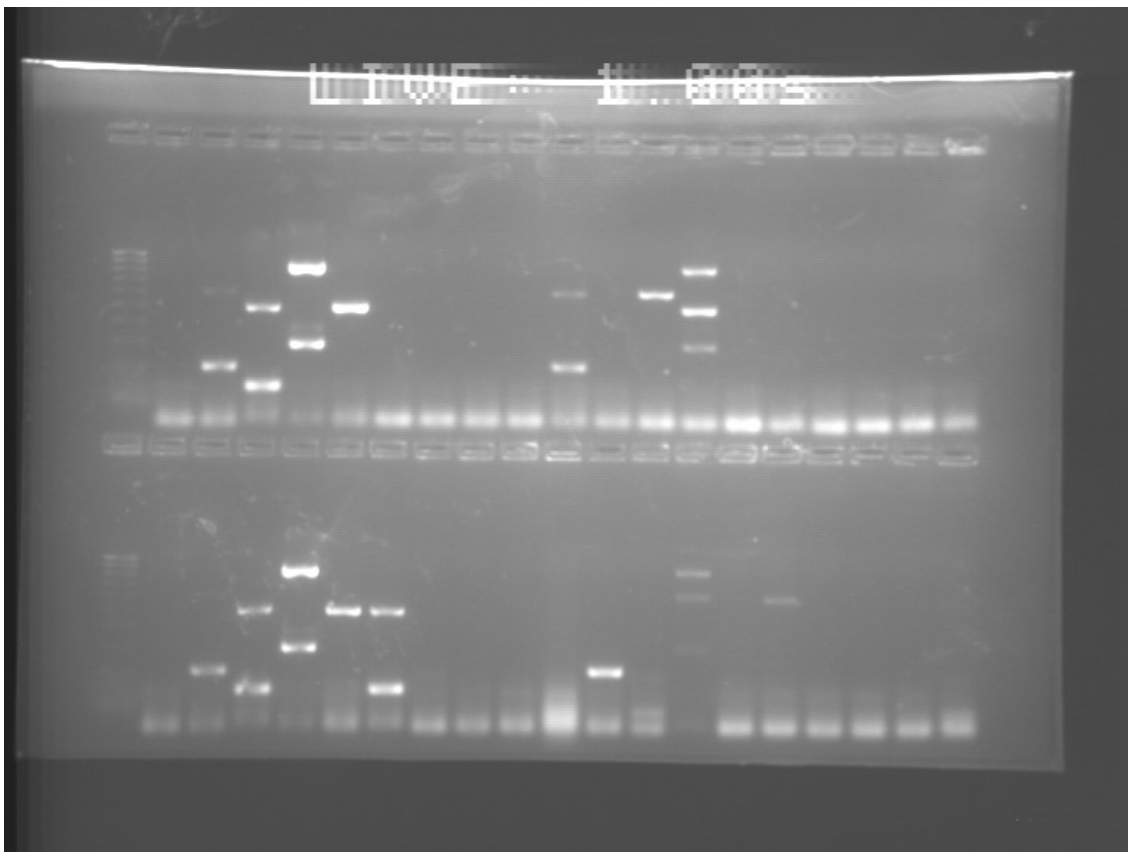


Figure 6 : photo d'un gel des pathotypes *Escherichia coli*

RESULTATS

4-RESULTATS

Notre étude nous a permis d'isoler un certain nombre de germes responsables de diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans. Ces germes sont repartis en fonction des critères suivants : critère de sélection, critère d'âge, critère de sexe et critère de la saison.

Tableau XIII : Répartition de la population en fonction de la tranche d'âge

Tranche d'âge	Population d'étude
0-11mois	1013
12-23mois	937
24-59mois	847
Total	2797

On voit que la tranche d'âge 0-11mois est la plus affectée avec une fréquence de 1013 sur 2797 soit environs 36%

Tableau XIV : Répartition de la population en fonction du sexe

Sexe	Population d'étude
Masculin	1587
Féminin	1210
Total	2797

Le sexe ratio est de 1.3 en faveur des garçons.

Tableau XV : Répartition de la population en fonction de la saison

	Saison			Total
	Saison fraiche	Saisonpluvieuse	Saison seche	
Nombre de Patients	942	1103	752	
Total	942	1103	752	2797

La majorité est obtenue à la saison pluvieuse avec une fréquence de 1103 sur 2797 soit 39%

Tableau XVI : Répartition d'*Aeromonas* par tranche d'âge

Tranche d'âge	<i>Aeromonas</i>		Total
	Négative	Positive	
0 - 11 mois	1012	1	1013
12 - 23 mois	936	1	937
24 - 59 mois	846	1	847
Total	2794	3	2797

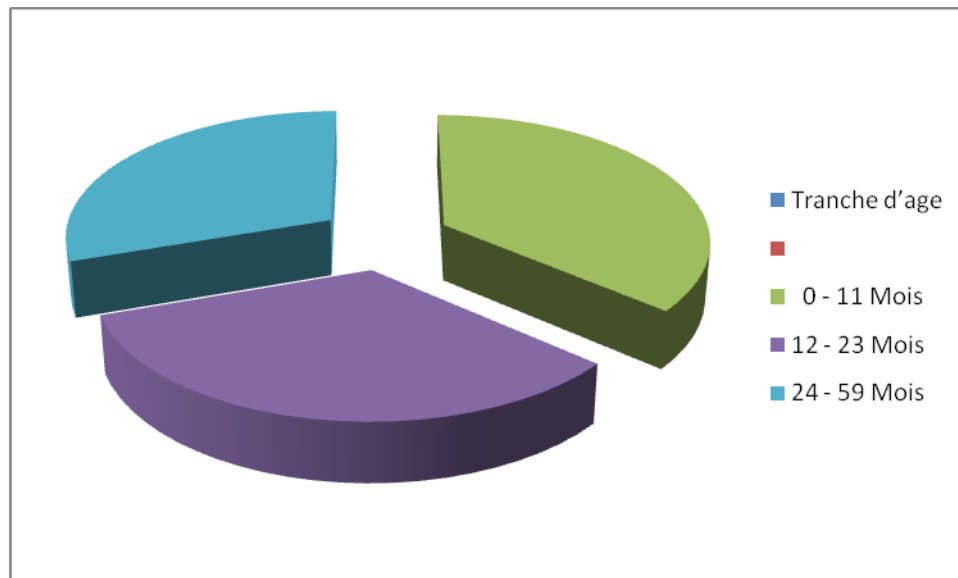


Tableau XVII : Répartition des *Campylobacters* par tranche d'âge

Tranche d'âge	Campylobacter			Total
	Spp	jejeuni	Négative	
0-11mois	32	3	978	1013
12-23 mois	30	6	901	937
24-59 mois	41	2	804	847
Total	103	11	2683	2797

Le *Campylobacter spp* était le plus fréquent avec 103 sur 2797 soit environs 4%

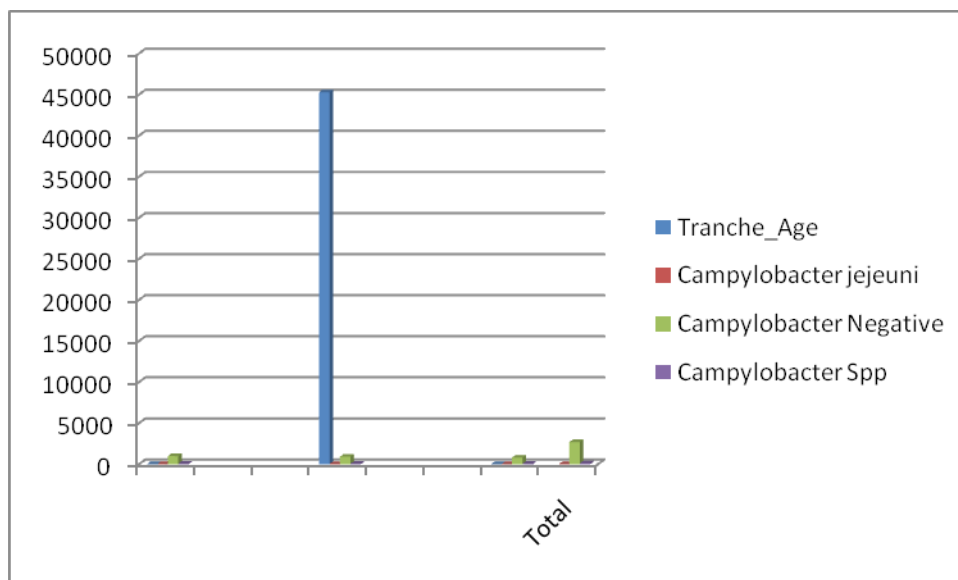


Tableau XVIII : Répartition des *Salmonellos* par tranche d'âge

Tranche d'âge	Salmonella		Total
	Négative	Positive	
0 - 11 mois	1011	2	1013
12 - 23 mois	937	0	937
24 - 59 mois	847	0	847
Total	2795	2	2797

Les enfants de 0-11 mois étaient les plus touchés avec une fréquence de 2 sur 2797 soit 0,07%

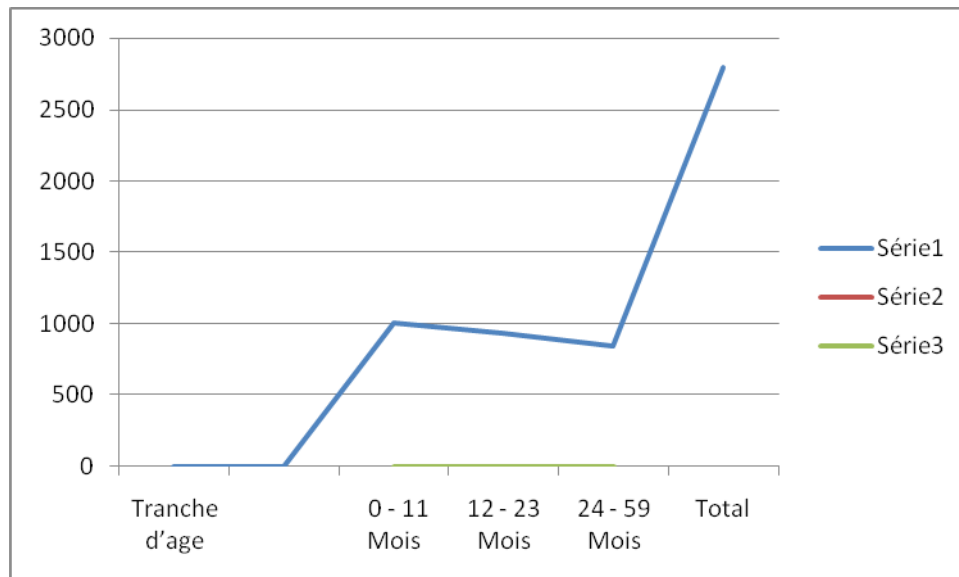


Tableau XIX : Répartition de types de **Shigellos** par tranche d'âge

Shigella	Tranche âge			Total
	0 - 11 mois	12 - 23 mois	24 - 59 mois	
boydii	1	0	0	1
flexneri 1a	0	2	1	3
flexneri 1b	3	1	0	4
flexneri 2a	1	2	2	5
flexneri 2b	2	4	0	6
flexneri 3a	1	0	1	2
flexneri 6	1	0	2	3
flexneri x	0	2	0	2
sonnei	1	1	3	5
dysenteriae	1	0	0	1
Total	11	12	9	32

Les plus touché par le shigella étaient les enfants de la tranche d'âge 12-23mois avec une fréquence de 12 sur 2797 soit 0,4%

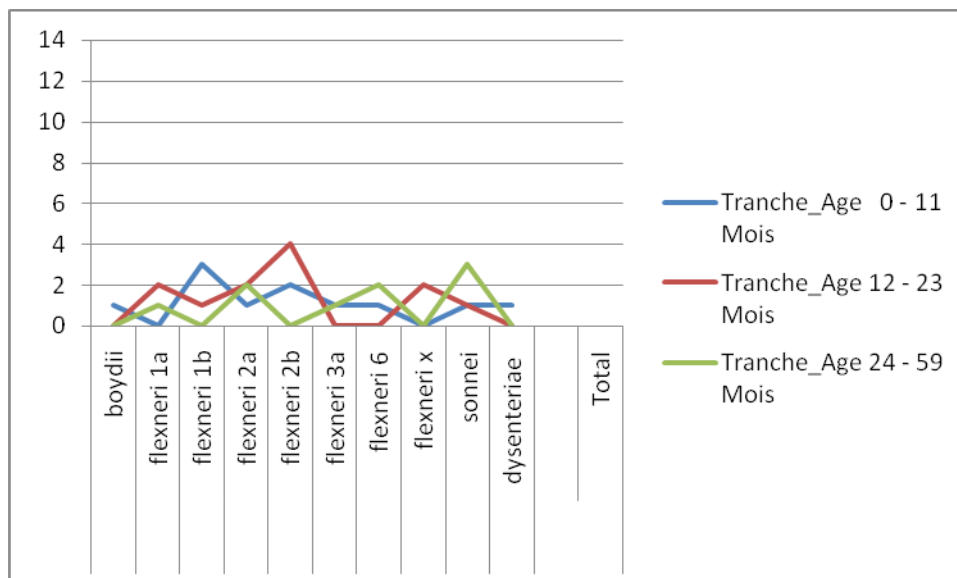


Tableau XX : Répartition des pathotypes d'*Escherichia coli* par tranche d'âge

E. coli	Tranche d'âge			Total
	0 - 11 mois	12 - 23 mois	24 - 59 mois	
EAEC	171	164	158	493
EPEC	93	84	76	253
ETEC	63	72	60	195
MIXTES	29	23	22	74
Total	356	343	316	1015

Les enfants de 0-11 mois étaient les plus vulnérables avec une fréquence de 356 sur 2797 soit environs 13%

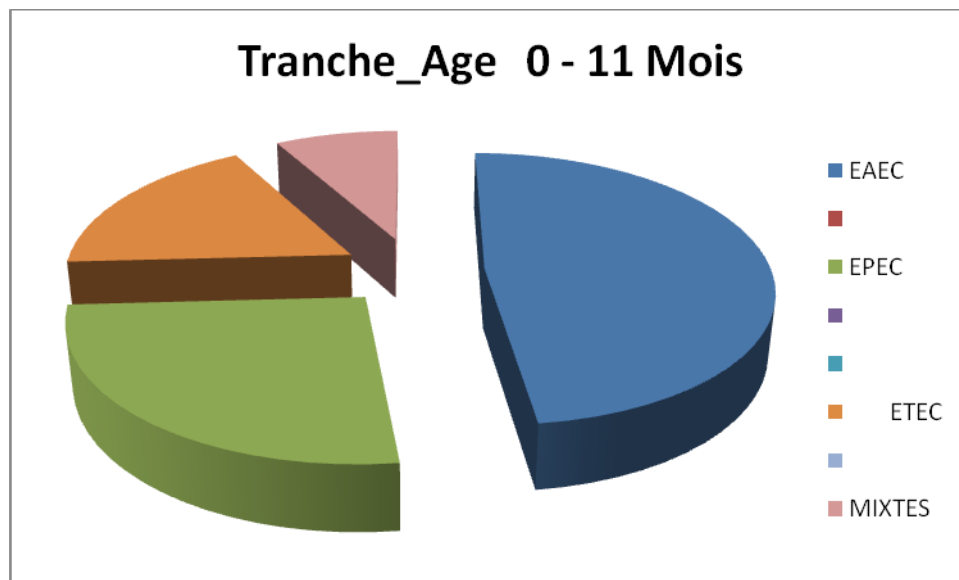


Tableau XXI : Répartition d' *Aeromonas* par sexe

Aeromonas	Sexe		Total
	Masculin	Feminin	
Spp	2	1	3
Négative	1585	1209	2794
Total	1587	1210	2797

Les garçons sont plus vulnérables que les filles avec une fréquence de 2 sur 2797 soit 0,07%

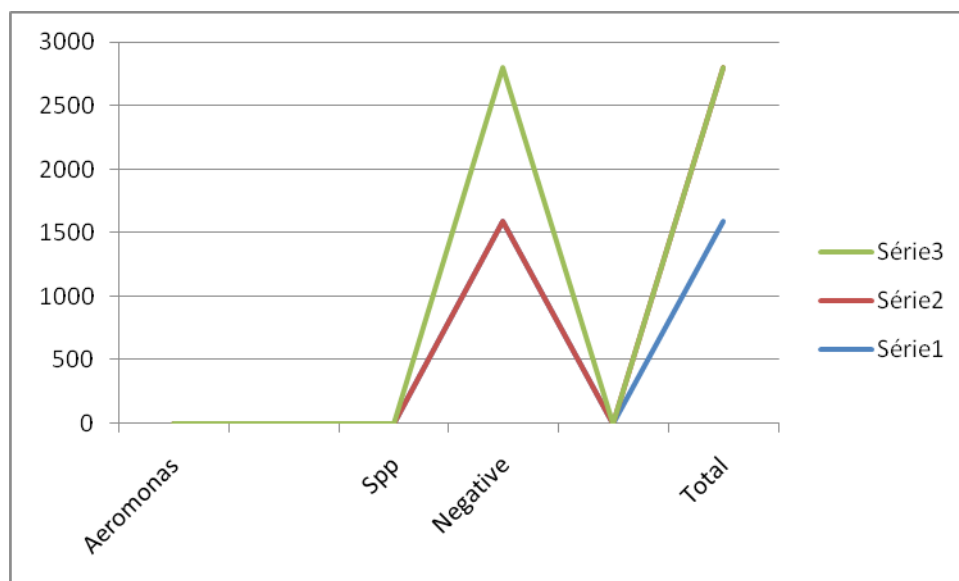


Tableau XXII : Répartition des **Campylobacter** par sexe

Campylobacter	Sexe		Total
	Masculin	Feminin	
Campylobacter Spp	53	50	103
Campylobacter jejeuni	7	4	11
Négative	1527	1156	2683
Total	1587	1210	2797

Les garçons sont plus vulnérables que les filles avec une fréquence de 60 sur 2797 soit 2%

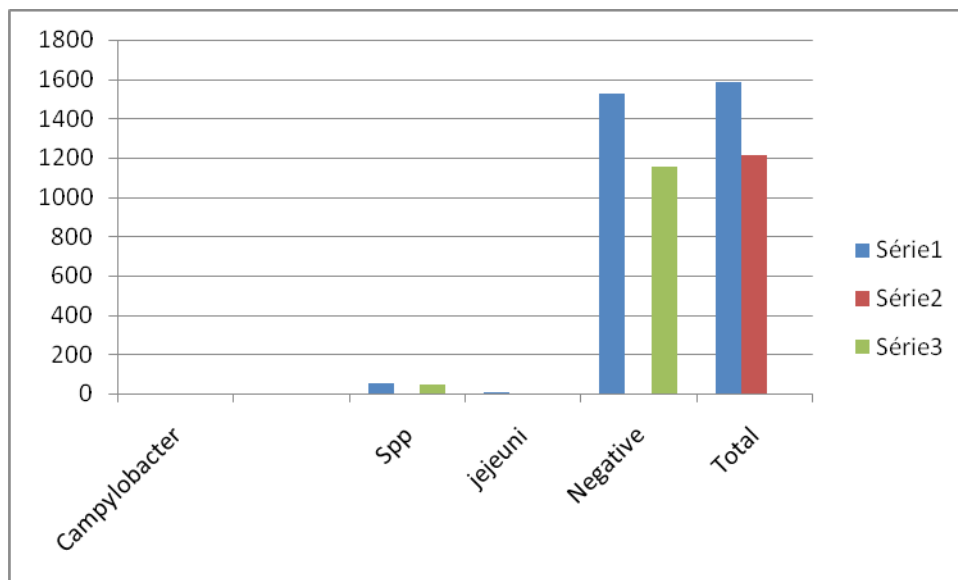


Tableau XXIII : Répartition des *Salmonellos* par sexe

<i>Salmonella</i>	Sexe		Total
	Masculin	Feminin	
Salmonella Spp	2	0	2
Négative	1585	1210	2795
Total	1587	1210	2797

Les garçons sont plus vulnérables que les filles avec une fréquence de 2 sur 2797 soit 0,07%

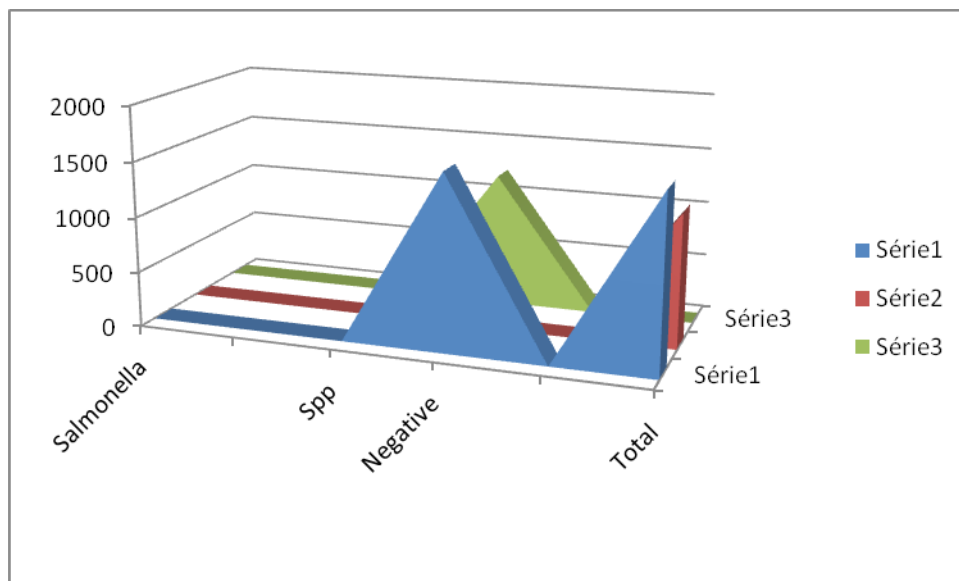
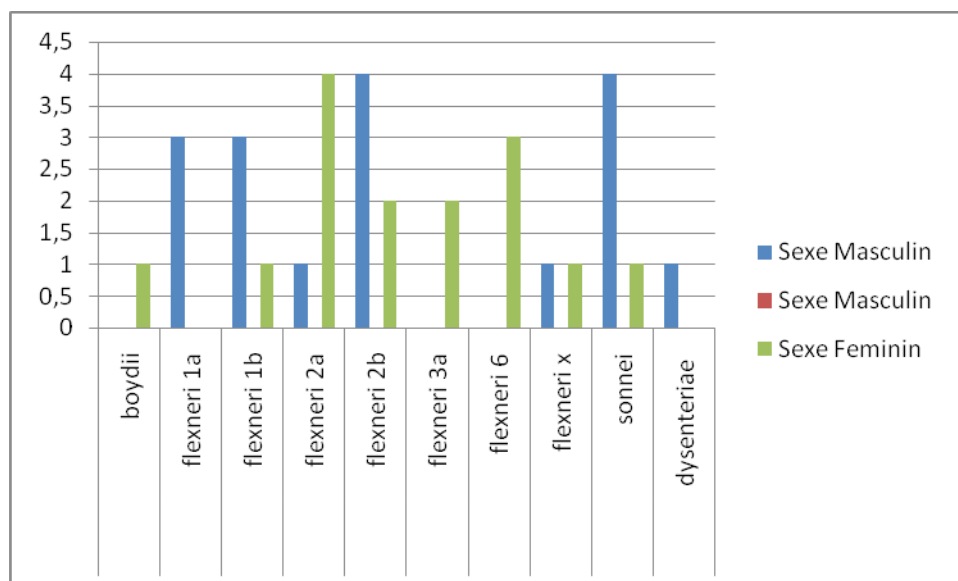


Tableau XXIV : Répartition de types de *Shigellos* par sexe

<i>Shigella</i>	Sexe		Total
	Masculin	Feminin	
boydii	0	1	1
flexneri 1a	3	0	3
flexneri 1b	3	1	4
flexneri 2a	1	4	5
flexneri 2b	4	2	6
flexneri 3a	0	2	2
flexneri 6	0	3	3
flexneri x	1	1	2
sonnei	4	1	5
dysenteriae	1	0	1
Total	17	15	32

Les garçons sont plus vulnérables que les filles avec une fréquence de 15 sur 2797 soit 0,5%



TableauXXV : Répartition des pathotypes d'*Escherichia coli* par sexe

E. coli	Sexe		Total
	Masculin	Feminin	
EAEC	276	217	493
EPEC	148	105	253
ETEC	107	88	195
MIXTES	37	37	74
Total	568	447	1015

Les garçons sont plus vulnérables que les filles avec une fréquence de 568 sur 2797 soit 20%

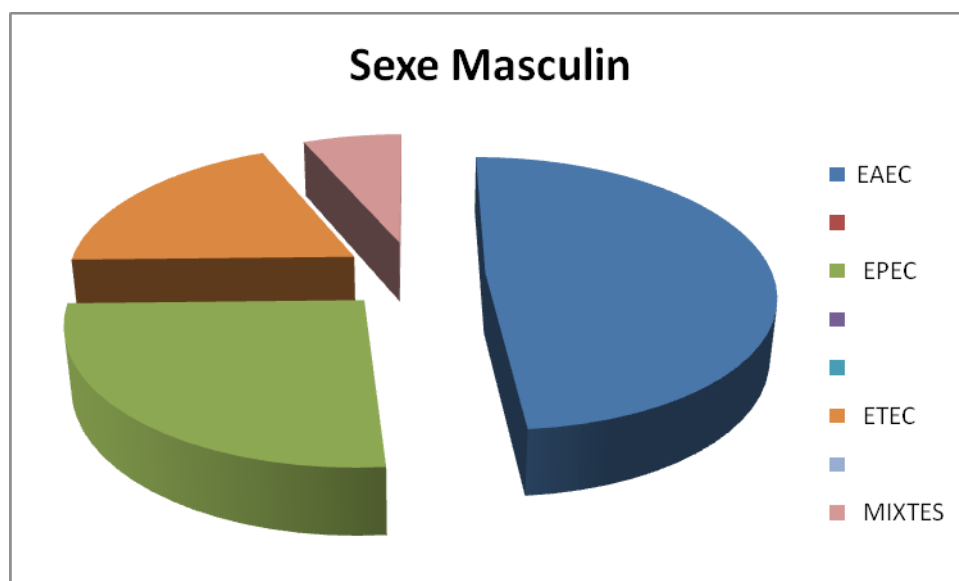
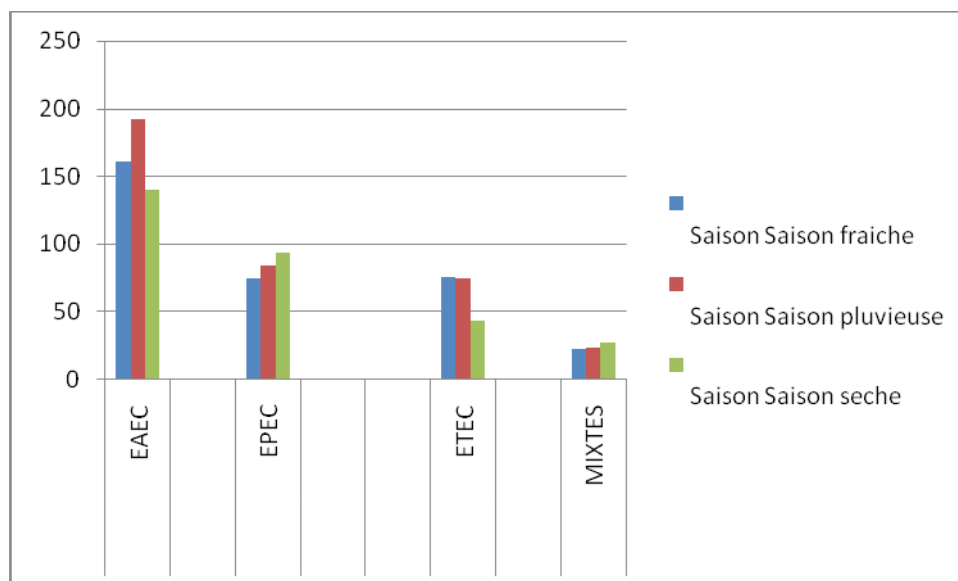


Tableau XXVI : Répartition des pathotypes d'*Escherichia coli* par saison

E. coli	Saison			Total
	Saison fraiche	Saison pluvieuse	Saison seche	
EAEC	161	192	140	493
EPEC	75	84	94	253
ETEC	76	75	44	195
MIXTES	23	24	27	74
Total	335	375	305	1015

La majorité est obtenue à la saison pluvieuse avec une fréquence de 375 sur 2797 soit 13%



COMMENTAIRES

&

DISCUSSION

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS :

-Du point de vue Méthodologie,

Nos échantillons de selles sont collectés chez les enfants de 0 à 5 ans présentant des épisodes de diarrhée admises dans 10 centres de santé au niveau du District de Bamako.

Les échantillons de selles sont ensuite acheminés au laboratoire de microbiologie dans des milieux de transport, dans les 18 heures qui suivent le prélèvement.

Une fois reçu le personnel vérifie les conditions d'acceptabilité.

Les échantillons sont par la suite portés sur des milieux de culture sélectifs et différentiels pour la recherche des bactéries après 24 à 48h d'incubation entre 35 et 37 degrés.

Les bactéries seront ensuite identifiées suivant leurs caractères culturels et biochimiques.

Les E. coli identifiés vont subir une PCR pour l'identification des pathotypes et génotypes.

-Du point de vue des résultats

Notre étude a porté sur 2797 enfants dont :

1013 enfants de 0 à 11 mois

937 enfants de 12 à 23 mois

847 enfants de 24 à 59 mois

Les enfants du sexe masculin étaient les plus représentés avec un total de 1587 enfant.

La saison des pluies a été la plus riche en échantillon de selles diarrhéiques soit un total de 1103 cas.

L'étude a révélé 1166 cas de diarrhées bactériennes incriminant une multitude de germes à savoir : *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Aeromonas* et **Salmonella**.

Les diarrhées à *Escherichia coli* furent les plus observées avec environ 87% des cas ; ont suivies celles à *Campylobacter*, *Shigella*, *Aeromonas* et **Salmonella** avec respectivement environ 10%, 3%, 0,3%, 0,2% des cas.

Parmi les pathotypes d'*Escherichia coli*, EAEC fut le plus rencontré avec environ 49% de cas de diarrhée à *Escherichia coli* . Les pathotypes et ETEC furent retrouvés respectivement chez 25% et 19% des enfants faisant des diarrhées à *Escherichia coli*. EPEC

La prédominance des EAEC a été rapportée par une étude menée au Brésil, EAEC ont été impliqués dans 68% des cas de diarrhée persistante [26]. qui représentent une part disproportionnée des décès dus à la diarrhée.

Les enfants entre 0 et 11 mois constituent la tranche d'âge la plus touchée 356 soit environ 35%, suivis de ceux entre 12 et 23 mois puis ceux entre 24 et 59 mois avec respectivement 343 et 316 soit environ 34% et 31%

Ces résultats sont semblables à ceux trouvés au Burkina avec 55,7 % des cas entre 0 à 11 mois [27]. Ce maximum de fréquence avant l'âge de un (1) an a également été rapporté par Coulibaly [28] en Côte d'Ivoire et Maaroufi en Tunisie [29], avec des fréquences respectives de 51 % et 46 %.

L'enfant avant un an est particulièrement exposé à la diarrhée pour un certain nombre de raisons :

- C'est à cette période que se développe progressivement l'immunité propre à l'enfant et baisse des anticorps d'origine maternelle. Alors le nourrisson est plus vulnérable aux infections.
- C'est également à cette période que commence la diversification alimentaire de l'enfant. Lorsque celle ci est mal conduite, la malnutrition puis la diarrhée survient.

Dans notre étude on a remarqué que les enfants sont plus touché pendant la saison pluvieuse avec 375 soit environ 37%.

Notre étude a connu des limites à certaines difficultés à l'accomplissement du travail.

- Au niveau de la collecte des selles, certains enfants avaient du mal à émettre suffisamment de selle pour être inclus dans l'étude, tout ceci à constitué un handicap pour l'obtention d'un échantillonnage représentatif.

- Refus de certains parents à la participation de leurs enfants à l'étude.

CONCLUSION

&

RECOMMANDATIONS

5. CONCLUSION

Notre étude a porté sur 2797 enfants de 0 à 59 mois ,1015 *Escherichia coli* pathogènes ont été isolés soit 36,29%,114 *Campylobacter* soit 4,08 et 32 *Shigella* soit 1,14% et 2 *Salmonella Spp* soit 0,07%.

Parmi les pathotypes des *Escherichia coli*, EAEC reste le pathotype le plus fréquent.

Des associations de pathotypes et germes mixtes ont été également observées
Escherichia coli, Shigella

Escherichia coli, Campylobacter

L'hiver reste la période à laquelle les diarrhées sont beaucoup plus fréquentes.

Recommandations

➤ **Aux autorités administratives et politiques**

Améliorer l'assainissement et l'approvisionnement en eau potable

Améliorer l'hygiène collective

Organiser des campagnes de sensibilisation sur les maladies diarrhéiques afin de mieux informer les populations.

➤ **Aux populations :**

La diarrhée peut être aussi liée aux conditions d'hygiène :

- les seins doivent être propres avant et après chaque allaitement,
- laver bien les mains au savon avant et après les repas.

REFERENCES

Référence Bibliographies :

1-F.PERCHERON.R PERLES abrégés de Biochimie générale et **M.J.FOGLIETTI** et **JE.COURTOIS** Preface de collection Abrégés de Pharmacie.

2-AOUSSI E. Les diarrhées bactériennes aiguës à Abidjan; à propos des 530 coprocultures. Thèse Doct. Med, 1983, no 403, 250 pages.

3-BERCHE P ET WEILO. Incidence et mortalité du cholera en Afrique en 1991-1992 Med. Mal infect, 1993, 23,92-98

4- PN CAMPBELL et AD SMITH Biochimie illustrée traduit en l'anglais par **G HAMOIR et A ADOUTTE** 1985, 240 pages.

5-LEVINE M, NATARO JP, HARCH H ET al.the diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependant on a plasmid encoding enteroadhesiveness factor.J.infect.Dis, 1985, 152:550-559 et 550-565.

6-BORDERON E, HORODNICEANU T.Metabolically deficient dwarf-colony mutant of *Escherichia coli*: deficiency and resistance to antibiotics of strain isolated from

7-BRENNER DJ, DAVIS BR, STEIGERWALT AG et al.Atypical biogroup of Escherichia coli found in chemical specimens and description of Escherichia hermanii sp.nov.J.clin.Microbiol, 1982,15,703-713

8-BRENNER DJ, MC WHORTER AC, LEETEKNUSTON JK al.Escherichia vulneris: a new species of enterobacteriaceae associated with human wounds.J.clin.Microbil, 1982, 15; 1130-140

9-CISSE F,OUANGRE RA,GAYE A,BOYE C,SOW AL et al Cause des gastro-entérites infectieuses de l'enfant à Dakar.Presse Médicale,1989,18,no 37.

- 10-CISSE F,OUANGRE RA,GAYE A,BOYE C,SOW AL** et al Cause des gastro-entérites infectieuses de l'enfant à Dakar.Presse Médicale,1989,18,no 37.
- 11-DAVID PRINCE M, MBOUP S, DENIS F, RICHARD C, BARIN F** et al. Gastroentérites à vibrio parahemolyticus au Sénégal. Med Mal infect, 1980, 10, 348-351
- 12-DGUID JP, ANDERSON ES.**I Fimbriae and adhesive properties in salmonella.J.PATH.Bat, 1966, 92: 107-138
- 13-FARMER JJ, J.clin** ET al.Biochemical identification of new species or biogroup of enterobacteriaceae isolated from clinical specimen. Microbiol, 1985, 21: 46-76
- 14-FARMER III JJ, DAVIS BR, HICKMANN-BRENNER F** ET al.Biochemical identification of new species and biogroup of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.Jclin.Microbiol, 1985, 21: 46-76
- 15-FARMER III JJ, FANING GR, DAVIS BR** ET al.Escherchia fergusonii and enterobacter taylorae, two new species of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.J.clin.Nicrobiol, 1985, 21:77-81
- 16-LEMINOR L, CHALON AM, VERON M,** Recherche sur la présence de l'antigène commun des enterobacteriaceae chez les Yarcina, Levinea, Aeromonas et Vibrio. Ann.Inst.Pasteur
- 17-LEVINE MM.***Escherichia coli* infection.In: GERMANIER R.Bacterial vaccines, Academic Press edit. NEW YORK, 1984, PP.187-235
- 18-AKELA PH, MAYER H.**Enterobacterial common antigen.bac.rev, 1976, 40: 591-632
- 19-RSCOV I, ORSCOV F, JANN B** ET al.serology, chemistry and genetic of O and K antigens of *Escherichia coli*.Bact.Rev, 1977, 41:667-710.

20-COTLAND SM, RICHMOND JE, ROWE B. Adhesion of enteropathogenic strain of *Escherichia coli* (EPEC) to Hep-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. *FEMS Microbiol. Let*, 1983, 20:191-195.

21-COTLAND SM, GROSS RJ, ROWE B. Laboratory tests for enterotoxin production, enteroinvasive and adhesion in diarrhoeagenic *Escherichia coli*. In: SUSSMANN: the virulence of *Escherichia coli* serogroup O159. *Lancet*, 1984, i: 1242-1243

22- ILVERMAN M, SIMON MI. Bacterial flagella. *ann.rev.Microbiol*, 1977, 31:397-419

23-[http:// coproweb.free.fr/pagbac/bacgenl.htm](http://coproweb.free.fr/pagbac/bacgenl.htm) 21-10-2009 à 15H08min

24-http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/commentaire/e_01.htm 30-10-2009 à 15H35min

25-[http:// médecine tropicale.free.fr/cours/diarrhees-infectieuses.htm](http://médecine tropicale.free.fr/cours/diarrhees-infectieuses.htm) 01-11-2009 à 16H40min

26-FANG GD, LIMA AAM, MARTINS CV, NATARO JP, GUERRANT RL. [Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study.](#) *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:137-44.

27-SANOUI I, KAM KL, TOUGOUMA A, SANGARÉ L, NIKIEMA JHP, SANOUI I, KOUETA F, DAO L, SAWADOGO SA, SOUDRE RB.
Diarrhées aiguës de l'enfant : aspects épidémiologiques, cliniques et évolutifs en milieu hospitalier à Ouagadougou

28-COULIBALY A, REY JL, DAVIS CE, SORO NB, DIARRA A, HOUENOU Y, TROLET C. Morbidité et mortalité hospitalières dues aux maladies diarrhéiques en Côte d'Ivoire. *Publications médicales africaines* 1988; 91:23-9

29-MAAROUFI S, BEN DRIDI MF, BEN CHAABANE T, ET AL. Épidémiologie des diarrhées aiguës infantiles. *Tunisie médicale* 1986; 64:673-7

30-DIOUF S, SARR M, SY H, ABDALLAHI OC, FALL M. Malnutrition et diarrhée chez l'enfant au CHU de Dakar. Aspects cliniques, épidémiologiques et biologiques. *Méd. Afr Nre* 1990; 37:29-32

31-NATARO, JAMSES, P., AND KAPER, JAMSES, B., Diarrheagenic *Escherichia coli*, 1998, *Clinical Microbiology Review*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

32-NGUYEN, TUNG VU, P., LE VAN, CHINH, LE HUY, NGUYEN , K, AND WEINTRUB,A, Detection and characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Yung Children in Hanoi, Vietnam.2005, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

33-LEVINE, M, ET al , 2006, *Diarrheal Disease in infants and Young Children in developing Countries*, CVD, University of Maryland, Baltimore.

34-OSWALD, E., H.SCHMIDT, S. MORABITO, H. KART, O.MARCHES, and A.CAPRIOLI. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. 2000. *Infect. Immun.*68:64-71.

35-HARTWELL, LEYLAND, H., Genetic-from genes to genomes.2000. McGraw-Hill Higher Education. New York.

36-Eppendorf Microfuge Operating Manual. Hamburg. Germany.2005

RESUMIE

Fiche signalétique

Nom : Soumaré

Prénom : Moustapha

Titre de la thèse : Génotypes et pathotypes d'*Escherichia coli* et autres bactéries responsables des diarrhées chez les enfants de moins de cinq ans à Bamako 2008-2010.

Année de soutenance : 2010-2011

Pays d'origine : Mali

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS)

Secteur d'intérêt : Microbiologie, Pédiatrie, Santé publique, Vaccinologie.

Résumé :

La diarrhée reste encore un problème majeur de santé publique surtout dans les pays en voie de développement.

Des progrès énormes ont été réalisés dans le contrôle et la prise en charge de ces maladies diarrhéiques.

Entre 2008 et 2010, une étude s'est réalisée chez les enfants de moins de cinq ans à fin de déterminer les souches bactériennes responsables de ces diarrhées.

2797 enfants ont été recrutés, parmi lesquels 35,07 % des cas constituent la tranche d'âge entre 0 à 11 mois.

Parmi les pathotypes des Escherichia coli rencontrés, les Escherichia coli enteroadhérents restent le plus fréquents avec une prédominance de 48,57%.

Beaucoup d'effort et d'engagement doivent être consentis pour améliorer les conditions de vie et de santé de ces enfants.

Mots clés : diarrhée, *E.coli*, EAEC, EPEC, ETEC, PCR, CVD-Mali, Bamako, Mali.

Card-Index Signalitic

Name : Soumaré

First name : Moustapha

Title : Genotypes and pathotypes of *Escherichia coli* and other bacteria causing diarrhea among children under five (5) years in Bamako from two thousand and eight (2008) to two thousand and ten (2010)

Academic year: 2008-2010

Country of origin: Mali

Place of defence: Bamako

Filing location: Library of the Faculty of Medicine and Pharmacy

Odontostomatologie (FMPOS)

Area of interest: Microbiology, Pediatrics, Public Health.

Abstract:

Diarrhea remains a major public health problem especially in countries developed heavy.

Enormous progress has been made in the control and management of diarrheal diseases.

Between 2008 and 2010, a study was conducted among children under five years at the end to determine the bacterial strains responsible for the diarrhea.

2797 children were recruited, among which 35,07% of cases are the installments from 0 to 11 months.

Among the pathotypes of *Escherichia coli* met, *Escherichia coli*

Enteroadherants remains the most common with a prevalence of 48,57%.

Much effort and commitment must be made to improve the living conditions and health of these children.

Keywords: Diarrhea, *Escherichia coli* Enteroadherants, *Escherichia coli* Enteric, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Polymerase chain Reaction, CVD-Mali, Bamako, Mali.

ANNEXES

Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) au Mali et ses activités :

Le centre est composé actuellement de deux blocs :

- Un bloc administratif composé de :
- Un laboratoire de recherche au rez-de-chaussée.
- L'administration est organisée comme suite :

Un (1) secrétariat principal,

Un (1) bureau du coordinateur,

Un (1) bureau du gestionnaire,

Un (1) bureau du comptable,

Deux (2) bureaux des médecins,

Une (1) salle de conférence,

Une (1) salle informatique et deux (2) bureaux des informaticiens,

Une salle (1) d'attente,

Un (1) magasin et

Deux (2) toilettes. (Hommes et femmes)

- Une unité clinique composée de :

Cinq (5) boxes de consultation,

Trois (3) bureaux,

Une (1) salle d'attente.

- Les personnels :

Vingt quatre (50) Médecins,

Huit (9) pharmaciens,

Une (1) biologiste,

Des étudiants stagiaires,

Des infirmiers,
Des techniciens de laboratoire,
Treize (13) agents sociaux,
Des informaticiens,
Deux (2) gestionnaires,
Deux (2) secrétaires,
Sept (7) manœuvres.

3.1.2 Les laboratoires de recherche :

- Mise en activité le 17 Décembre 2004 est composé de :

Une (1) Unité de microbiologie,
Une (1) Unité d'immunologie,
Une (1) Unité pour l'étude de la grippe (Labo FLU),
Un (1) bureau du microbiologiste,
Un (1) bureau de l'immunologiste,
Un (1) bureau des techniciens,
Une (1) chambre noire (lecture sous UV),
Une salle de préparation des milieux de travail,
Une (1) chambre froide,
Une salle de stérilisation, et
Une toilette.

- Les personnels sont :

Un (1) Pharmacien microbiologiste,
Un (1) Pharmacien immunologiste,
Cinq (7) Pharmaciens généralistes,
Deux (2) Médecins généralistes,
Quatre (3) internes (pharmaciens),
Une (1) étudiante en mémoire D.E.A
Deux (2) techniciens de labo,

Deux (2) techniciens supérieur.

3.1.3 Matériels, Milieux et Réactifs :

3.1.3.1. Matériels :

- La balance
- La plaque chauffante
- Le Bain-marie
- Autoclave
- Hôte
- microscope
- incubateurs de 37° et de 4°
- incinérateurs
- extincteurs
- vortex
- Lumière ultraviolet
- Thermo cycler
- Micro-onde
- Réfrigérateur de 2° à 8°
- Congélateurs de -20° et de -80°
- Ordinateurs
- cuve pour électrophorèse

3.1.3.2. Milieux

-Les milieux de transport :

- ✓ Buffered glycérol saline : BGS
- ✓ Cary-Blair : CB

-Les milieux d'incubation :

- Gélose xylose lactose desoxycholate : XLD
- ✓ Gélose Mac conkey
- ✓ Gelose thiosulfate citrate bile sucrose : TCBS

- ✓ Gelose campy blood : CBA
- ✓ Alkaline peptone water
- ✓ Gelose *Aeromonas*(RYAN)
- ✓ Gelose urea
- ✓ Gelose Mueller Hinton
- ✓ Gelose lysine decarboxylase : LDC
- ✓ Gélose triple sugar Iron : TSI
- ✓ Gélose trypticase soy : TSA
- ✓ Motilité indole ornithine : MIO
- ✓ Bouillon BGN
- ✓ Na Cl : 0%, 6%, 8%

3.1.3.3. Réactifs

Les réactifs utilisés sont:

Réactifs pour identification:

- Kit de coloration Gram :
- violet de gentiane
- lugol
- alcool
- fuschine basique
- eau distillée
- Catalase
- Oxydase
- Indole
- Antisérums
- Sodium hippurique
- Ninhidrine
- Disque O/129

Pour la P C R :

- ✓ Eau distillée
- ✓ dNTPS
- ✓ 1 Kb
- ✓ DNA
- ✓ Bromure d'ethidium (solution)
- ✓ Le TAE 50X buffer
- ✓ Bleu de méthylène
- ✓ Les amorces :
 - LT
 - ST
 - bfpA
 - aatA
 - aaiC
 - eae
- ✓ Taq DNA polymérase

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'opprobres et méprisés de mes confrères si j'y manque

Je le jure.