

**MINISTÈRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE, SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Année Universitaire 2008 – 2009

Thèse N° _____/P

**TYPAGE DES SOUCHES DE SALMONELLA ISOLEES AU
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DU CVD DU CHU
GABRIEL TOURE DE JANVIER 2005 A MAI 2006.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 05 / 12 / 2008

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

Par Mr MALLE Dramane.

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr Amadou DIALLO

**Membres : Pr Soukalo Dao
Dr Broulaye TRAORE**

Co- directeur : Dr Souleymane DIALLO

Directeur : Pr Flabou BOUGOUDOGO

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 CHIRUGICALES :

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	Ophtalmologie
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	Ophtalmologie
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	Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophtalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie – Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophtalmologie
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
Mr Sounkalo DAO	Maladies Infectieuses

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 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

Je dédie ce travail :

A l'Eternel **ALLAH** : Le Tout Puissant, Le Miséricordieux qui m'a accordé la chance de commencer et d'achever ce travail en parfaite santé.

A mon père : **Oumar MALLE**

Tu resteras pour moi un model de chef de famille analphabète ayant eu le courage d'envoyer tous ses enfants à l'école. Ta patience et ton courage me serviront de leçon.

A ma mère : **Korotoumou DAO**

Ta grande affection maternelle, ta bonne conduite dans l'éducation, ton esprit d'amabilité envers d'autrui font de toi une mère de famille exemplaire. Que DIEU vous accorde la chance de cueillir le fruit de l'arbre que vous avez planté.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à :

Tous mes enseignants depuis le cycle primaire jusqu'à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie ;

Mr **Kodouba DAOU** et famille ;

Aux Docteurs : **Diadié MAIGA** (DPM), **Toumassé DIARRA** (officine DRAMELDO), **Boubou TAMBOURA** (CNAM) ;

Aux cousins **Fodé KONE** et famille, **OUMAR DAOU** et famille, **Alou DAOU**;

Au personnel du journal « l'indicateur du renouveau » : **Dramane A KONE** et **Markatié DAOU**.

A ma très chère fiancée Mlle Adjara DIALLO

A tous mes aîné(e)s Docteurs du laboratoire du CVD (HGT) : M^{me} **CAMARA Tenin SAMAKE**, **Samba A SANGARE**, **Cheik F DIABATE**, et du CVD (CNAM): **Aliou TOURE**, M^{me} **TRAORE Mariam SAMAKE**.

Mrs **Nouhoum KONE** et **Nouhoum SIDIBE** pour leur apport documentaire ;

A tous les membres de la grande famille « **DUBA** » et de la « **Dream Family** » ;

A tous les ressortissants de Kamona résidants à Bamako.

Tout le personnel du service de laboratoire du CHU Gabriel TOURE, de l'officine DRAMELDO et du CNAM.

Mes frères amis **Mamadou** et **Siaka MALLE** ;

Tous mes amis promotionnaires du laboratoire ;

Tous ceux qui, de près ou de loin, ayant contribué à la bonne réalisation de ce travail.

Je remercie tous les patients dont les produits pathologiques ont été utilisés pour l'analyse médicale au laboratoire et qui nous ont servi comme source de données.

En fin je rends hommage aux amis qui nous ont quitté prématurément (feux : **Yacouba HASSANE**, **Samuel O ADOLPHE**, **Sidiki DIAKITE**) après toutes ces années d'études pharmaceutiques, qu'ALLAH leurs accordent sa grâce éternelle. Amen !

A notre Maître et président du jury

Professeur Amadou DIALLO :

Professeur de biologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie,

Vice Recteur de l'Université de Bamako.

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

Véritable bibliothèque vivante, vous n'avez cessé de nous fasciner par la grandeur de votre simplicité, la splendeur de vos enseignements et l'ampleur de votre expérience.

Nous avons très tôt appréhendé et apprécié votre parfait engagement pour le bon déroulement de ce travail.

Nous vous prions cher Maître, d'accepter nos sincères remerciements.

A notre Maître et juge

Professeur Sounkalo DAO

Maître de conférences à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie,

Responsables de l'enseignement des maladies infectieuses à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie,

Investigateur clinique au CeReFo sur la tuberculose/ VIH.

Cher Maître, vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Homme aux qualités scientifiques énormes, nous avons été séduits par la simplicité, la clarté et la rigueur de vos enseignements.

En plus de vos connaissances scientifiques, votre sens social de la vie nécessite le respect.

A notre Maître et juge

Docteur Broulaye TRAORE

Chef de service de la pédiatrie du CHU Gabriel TOURE,

**Chargé des cours de pédiatrie à l'Institut National de Formation en
Science de la Santé,**

Président de l'AMALDEM de Bamako.

Cher maître, malgré vos innombrables occupations vous nous avez honorés en acceptant de siéger à ce jury. Vos qualités d'homme simple et aimable ne pour ne citer que celles-ci nous ont fortement impressionné.

Soyez rassurer de nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur FLABOU BOUGOUDOGO

Maître de conférences agrégé en Bactériologie- Virologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie ;

Chargé des cours de Bactériologie- Virologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie,

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

Chevalier de l'ordre du mérite de la santé.

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

Homme de science : courage, patience, rigueur sont autant de talent qui font de vous un chercheur admirable. En plus de vos qualités de chercheur aguerri, nous avons vite apprécié vos immenses qualités humaines et sociales. Vos remarques et suggestions ont sans doute été la clé de la réussite de cet œuvre.

Veillez accepter cher Maître nos sincères remerciements.

A notre maître et co-directeur de thèse :

Docteur Souleymane DIALLO

Pharmacien biologiste, chef de service du laboratoire du CHU Gabriel TOURE.

Assistant chargé des cours de Bactériologie- Virologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- stomatologie,

C'est un grand honneur pour nous de vous avoir comme co-directeur de thèse. Compétence, exigence et bienveillance sont bien de qualités qui, en vous sans exagération, forcent la fascination et même l'admiration.

Nous avons eu l'occasion d'apprécier votre courage, vos qualités humaines et scientifiques, et soyez sûr que nous tirerons leçons.

La réussite de ce travail est sans doute le résultat de votre parfait engagement.

Soyez rassurer de notre profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1. OBJECTIFS.....	3
1.1. Objectif général	3
1.2. Objectifs spécifiques.....	3
2. GENERALITES SUR LES SALMONELLA.....	4
2.1. Historique.....	4
2.2. Définition et systématique.....	5
2.3. Habitat.....	6
2.4. Physiopathologie.....	6
2.4.1. Pouvoir pathogène naturel.....	6
2.4.2 Pathogénie.....	7
2.5. Caractères bactériologiques.....	8
2.5.1 Morphologie et colorabilité.....	8
2.5.2. Caractères cultureux et milieux de cultures.....	8
2.5.3 Caractères biochimiques.....	11
2.5.4. Caractères antigéniques.....	12
2.5.4.1 Antigènes de paroi ou antigènes O	12
2.5.4.2 Antigènes d'enveloppe.....	13
2.5.4.3 Antigènes flagellaires ou Antigènes H.....	13
2.5.4.4 Identification d'un sérovar.....	15
2.6. Nomenclature.....	16
2.7. Diagnostic biologique.....	18
2.7.1. Méthode indirecte.....	18
2.7.2. Méthode directe.....	18
2.7.2.1. Sang pour hémoculture.....	19
2.7.2.2. Selles pour Coproculture.....	21
2.7.2.3. LCR.....	26
2.7.3. Méthodes moléculaires pour la caractérisation des salmonelles.....	27
2.7.3.1. Caractérisation de protéines : l'analyse des iso-enzymes.....	27

2.7.3.2. Les marqueurs génotypiques pour la caractérisation des salmonelles.....	27
2.8. Contrôle de l'infection.....	28
2.8.1 Epidémiologie.....	28
2.8.2 Prophylaxie.....	29
3. METHODOLOGIE.....	32
3.1. Cadre d'étude	32
3.2. Etude.....	33
3.3. Collecte de données.....	34
3.3.1. Interrogatoire.....	34
3.3.2. Analyses de laboratoire.....	34
3.3.2.1. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques.....	34
3.3.2.1.1. Traitement des prélèvements de LCR.....	35
3.3.2.1.2. Protocole de travail du LCR.....	36
3.3.2.1.3. Protocole de technique des hémocultures positives.....	36
3.3.2.2. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	38
3.3.2.2.1. Coloration de Gram.....	38
3.3.2.2.2. Tests biochimiques et métaboliques : Api 20 ^E	40
3.3.3. Test de Sensibilité des antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer.....	43
3.3.4. Sérogroupage.....	47
3.4. Traitement informatique des données.....	50
3.5. Aspects éthiques.....	50
3.5.1. Consentement des malades.....	50
3.5.2. Inconvénients potentiels de cette étude.....	51
3.5.3. Bénéfices de cette étude.....	52
3.6. Chronogramme des activités.....	52
4. PRESENTATION DES RESULTATS.....	53
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	62
6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	64
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65

ANNEXES

INTRODUCTION

Les ***Salmonella*** sont des bactéries à Gram négatif. Ce nom leur a été attribué en hommage au vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon dont la contribution à l'étude de ces bactéries fut énorme. Le genre ***Salmonella*** appartient à la famille des ENTEROBACTERIACEAE. Cette famille comporte actuellement plus de 120 espèces génomiques. Les ***Salmonella*** sont responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes A, B et C. [18]

En clinique les fièvres typhoïdes qui surviennent généralement, approximativement 80 % sont causées par ***Salmonella enterica*** sérovar **Typhi** et 20 % par ***Salmonella Paratyphi A*** et **B**. [11]

Tandis que la fréquence et l'incidence des infections à ***Salmonella Typhi*** et à ***Salmonella Paratyphi A*** et **B** sont beaucoup plus connues en Asie et en Amérique Latine, il y a un manque d'informations semblables en Afrique au sud du Sahara. Plusieurs raisons contribuent à ce vide relatif.

Il y a un nombre insuffisant de laboratoires de microbiologie clinique capables d'entreprendre la surveillance systématique d'hémoculture. Ce nombre est limité dans les pays développés et moindre en Afrique au sud du Sahara où le fardeau de la maladie peut être le plus élevé.

Des difficultés logistiques existent quant à la qualité sérologique des réactifs nécessaires, particulièrement pour le typage des antigènes flagellaires H.

Même si les réactifs de typage des antigènes O et H sont disponibles, l'expertise technique exigée et appropriée pour le typage H ne l'est pas souvent. [21]

Selon une étude réalisée au laboratoire d'analyses médicales du CVD du CHU Gabriel TOURE de 2002 à 2004 le taux de ***Salmonella spp*** était de 50,70 % sur 290 ***Salmonella*** isolées dans les prélèvements d'hémocultures et de liquide céphalo- rachidien. [29]

Vu la multiplicité des sérovars et la difficulté de sérogroupage nous avons jugé nécessaire de mener cette étude au laboratoire de bactériologie du CVD du CHU Gabriel TOURE de janvier 2005 à mai 2006.

Nos résultats sont comparés avec ceux de nos laboratoires partenaires du CVD Baltimore aux Etats-Unis.

Pour ce faire nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. OBJECTIFS :

1.1. Objectif général

Contribuer à l'identification des souches de *Salmonella* isolées au laboratoire du CVD du CHU de Gabriel TOURE de Bamako.

1.2. Objectifs spécifiques

- Identifier les souches de *Salmonella* isolées au laboratoire du CVD du CHU Gabriel TOURE par sérotypage et genotypage ;
- Décrire le profil socio- démographique des patients souffrants de salmonellose ;
- Faire le profil antibiotypique des souches isolées.
- Identifier les problèmes liés aux sérogroupages ;

2. GENERALITES

2.1. Historique :

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 **dothiéntenterite**. 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, **Gaffky** réalise la première culture de ce bacille dénommé **Salmonella Typhi**. [3]

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. [3] [4]

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.

En 1948, le chloramphénicol a été découvert de même que ses applications thérapeutiques dans les salmonelloses. [6]

2.2. Définition et systématique

Les **Salmonella** appartiennent à la famille des ENTEROBACTERIACEAE, bacilles Gram négatif (BGN), 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. [18]

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)**, **Salama (II)**, **arizona (IIIa)**, **diarizona (IIIb)**, **houtena (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 **Arizona hinshawii**. [28] 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. [18]

2.3. Habitat

Le réservoir naturel des **Salmonella** est très large et s'étend à tout le monde animal.

Les **Salmonella** sont essentiellement des bactéries de l'intestin des animaux vertébrés [4]. Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par les excréta [4] [17] [24]. 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] [7].

2.4. Physiopathologie

2.4.1. 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. [10]

Certains sérotypes très virulents apparaissent pathogènes seulement pour une espèce animale donnée. 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. [22] 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 digestif. [20] Les ***Salmonella abortus*** et ***Salmonella ovis*** 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 préférentiels. [22] Ces sérotypes sont des agents de toxi-infections alimentaires chez l'homme, leur passage dans le sang est exceptionnel, mais certains auteurs soulignent des cas de septicémies graves chez des immunodéprimés et chez des leucémiques. [18] En outre, ces sérotypes ubiquitaires peuvent provoquer des épidémies dans les services de pédiatrie. 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 ans. [2]

On note un portage fécal ou urinaire chez les malades atteints de schistosomiase ; 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, des infections uro-génitales sont exceptionnelles quoique des cas aient été cités par différents auteurs. 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. [19]

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

2.4.2 Pathogénie

Les ***Salmonella*** sont des bactéries entéro- pathogènes invasives. A partir d'expérience chez des volontaires sains, la dose infectante a été estimée entre 10^5 - 10^9 UFC/ml. [10] 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 réticulo-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 propria* 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 tymphos 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. [5]

2.5. Caractères bactériologiques

2.5.1 Morphologie et colorabilité :

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif. [10] [24] 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. (Voir figure n°1)



figure n° 1 : Les *Salmonella* vues au microscope électronique.

2.5.2. Caractères culturaux 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 SS, 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*. [18] 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) [32]


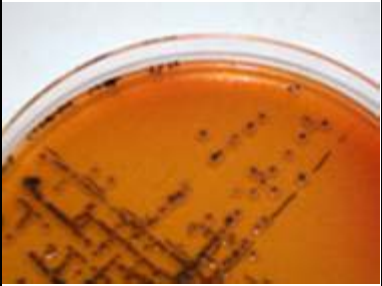
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Isolement par la méthode des cadrons. Incuber 18 à 24 h à 37°C.	Le milieu contient des inhibiteurs : - sels biliaires, - vert brillant - forte concentration en citrate de sodium. Ceux-ci empêchent la poussée 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°2 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.

- Gélose Hecktoen [32]


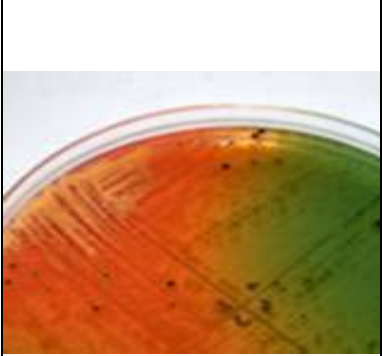
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	L'ensemencement se fait par les techniques habituelles.	Deux indicateurs sont présents dans le milieu : - le bleu de bromothymol (indicateur de pH) - la fuschine acide (qui se colore en 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 : Escherichia, Levinea, Citrobacter diversus, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Yersinia Colonies saumon à centre noir : Citrobacter freundii, Proteus vulgaris, Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de Salmonella, à différencier de Proteus mirabilis Colonies bleu-vert ou vertes : Suspicion de Shigella ou de Salmonella
				

figure n°3 : La gélose Hecktoen 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.

2.5.3 Caractères biochimiques [18]

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

2.5.4. Caractères antigéniques. [20]

Les *Salmonella*, comme toutes les entérobactéries 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.

2.5.4.1 Antigènes de paroi ou antigène O

L'étude par absorption croisée des immun- sérums 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. [18]

- 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 à la spécificité du facteur O majeur par une enzyme à déterminisme chromosomique.

1) par une enzyme à détermination chromosomique le facteur O5 résulte de l'addition d'un radical acétyle sur l'abéquose, sucre constitutif du polysaccharide des sérovars du groupe B et qui n'existe pas dans les autres groupes O. Le facteur O5 ne peut donc exister que chez les souches qui ont le facteur O4, si elles possèdent une acétylase de l'abéquose. Ceci explique aussi que les souches fortement agglutinables par le sérum anti O5, sont

plus faiblement agglutinables par le sérum anti O4, puisque le O5 est une modification de ce dernier ;

2) par une information codée par un bactériophage (conversion lysogénique). Tous les phages convertisseurs, c'est-à-dire ceux qui causent une modification de la spécificité de l'antigène O des *Salmonella* quand le génome est présent chez la bactérie, ont un ADN bicaténaire, ce qui les rend aptes à la transduction et à l'intégration dans la continuité du chromosome bactérien. Tous ont une morphologie similaire : tête polyédrique, courte queue avec plaque terminale mais sans gaine protéique contractile ;

3) par une information codée par un plasmide (cas du facteur O54). [18]

2.5.4.2 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**. Les souches de ces sérovars ne possèdent pas obligatoirement l'antigène Vi. Les souches **Typhi** riches en antigène Vi et O inagglutinables sont dites sous forme V, celles qui n'en possèdent pas et sont O agglutinables sont dites sous forme VW. Elles sont les plus souvent constituées d'un mélange de bactéries les unes sous forme V, les autres sous forme W. [18]

2.5.4.3 Antigènes flagellaires ou Antigènes H

Les flagelles sont des polymères de flagelline, molécules de protéine fibreuse, d'un poids moléculaire de 40 000 daltons 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. [18] Certains sérotypes ont un antigène H monospécifique : quand ils sont mobiles, ils ont un antigène H ayant toujours la même spécificité : ainsi **Salmonella Paratyphi A** a toujours un même antigène H désigné H : a ; **Salmonella enteritidis** l'antigène H : g, m ; **Salmonella Typhi** l'antigène H : d. La culture de ces souches respectives en présence d'anti- sérum a, g, m, ou d, elles sont immobilisées. D'autres sérotypes ont un antigène H qui peut présenter deux spécificités totalement différentes. Ainsi une souche de **Salmonella Paratyphi B** peut être agglutinée, au moment de son isolement, uniquement par le sérum anti- b. Mais si nous les cultivons sur gélose molle additionnée de ce sérum anti- b, nous constatons qu'elle n'est pas immobilisée et que la culture qui a envahi la surface n'est plus agglutinée par le sérum anti- b. Elle le sera par un autre sérum dénommé anti-1, 2. En fait, nous avons, en cultivant en présence de sérum anti- b, sélectionné les mutants ne possédant pas antigène de spécificité b, mais possédant une spécificité autre qui, pour **Salmonella Paratyphi B**, est toujours 1, 2. Il est possible de faire l'inverse : en cultivant notre deuxième culture en présence de sérum anti-1, 2, nous retrouverons une agglutinabilité dans le sérum anti-b.

L'antigène H de **Salmonella paratyphi B** peut donc exister sous deux phases : b et 1,2. En cultivant en présence du sérum correspondant à la phase apparente, on réalise une inversion de phase. Bien souvent une culture en nappe de **Salmonella Paratyphi B** est mixte, agglutinabilité d'emblée par les sérums anti- b et anti-1,2, parce que contenant un mélange de bactéries possédant les unes des flagelles de spécificité b, d'autres des flagelles de spécificité 1,2. Toute culture de **Salmonella Paratyphi B** cultivée sur gélose molle additionnée à la fois de sérum anti- b et de sérum anti-1,2, est immobilisée.

L'étude des antigènes O, H et Vi a abouti à l'établissement d'un catalogue des formules antigéniques, le schéma de KAUFFMANN-WHITE

Tableau N°I : formules antigéniques des sérotypes de salmonella les plus fréquents [18]

Mélange O	Groupe	Nom usuel	Antigène O	Antigène H		
				Phase 1	Phase 2	
OMA	B	Paratyphi B	<u>1, 4, (5), ,12</u>			
		Wien	<u>1, 4, 12, 27</u>	b	1, 2	
		Stanley	<u>1, 4,(5) 12, 27</u>	b	1, w	
		Duisburg	<u>1, 4, 12, 27</u>	d	1, 2	
		Saint Paul	<u>1, 4,(5) 12, 27</u>	e, h	e, n, z15	
		Reading	<u>1, 4,(5) 12</u>	e, h	1, 2	
		Chester	<u>1, 4,(5) 12</u>	e, h	1, 5	
		Derby	<u>1, 4,(5) 12</u>	f, g	e, n, x	
		Agona	<u>1, 4,12</u>	f, g, s	(1, 2)	
		Typhimurium	<u>1, 4,(5) 12</u>	i	-	
		Brandenburg	<u>1, 4,(5) 12</u>	i, v	1, 2	
		Heidelberg	<u>1, 4, 12</u>	r	1, 2	
		Coeln	<u>4, (5), 12</u>	y	-	
		Essen	<u>4, 12</u>	g, m	1, 6	
Abortusovis		c				
OMB	C	Paratyphi C	6, 7 (Vi)	c	1, 5	
		Choleraesuis	6, 7	c	1, 5	
		Isangi	6, 7	d	1, 5	
		C1	Livingstone	6, 7	d	1, w
			Eimsbuttel	<u>6, 7, 14</u>	d	1, w
			Montevideo	6, 7	g, m, s	-
			Oranienburg	6, 7	m, t	-
		Thompson	6, 7	k	1, 5	
	Infantis	6, 7	r	1, 5		
	C2	Muenchen	6, 8	d	1, 2	
		Manhattan	6, 8	d	1, 5	
		Newport	6, 8	e, h	1, 2	
		Blockley	6, 8	k	1, 5	
		Lichtfeld	6, 8	l, v	1, 2	
Bovismorbificans		6, 8	r	1, 5		
OMA	D	Typhi	9, 12 (Vi)	d	-	
		Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-	
		Dublin	1, 9, 12	g, p	-	
		Gallinarum (volailles)	1, 9, 12	-	-	
		Panama	1, 9, 12	l, v	1, 5	
		Strasbourg	(9), 46	D	1, 7	
OMA	E (7 %) E1	Muenster	3, 10	e, h	1, 5	
		Anatum	3, 10	e, h	1, 6	
		Meleagridis	3, 10	e, h	1,w	
		London	3, 10	l, v	1, 6	
		Give	3, 10 (15)	l,v	1, 7	
	E4	Senftenberg	1, 3, 19	g, [s], t	-	
OMB	G (2 %)	Kedougou	1, 13, 23	I	1, w	
		Worthington	1, 13, 23	Z	1,5	
OMB	A (0,26)	Paratyphi A (Afrique, Asie)	1, 2, 12	A	-	

. Facteurs entre crochets : peuvent être absents sans que le sérotype soit changé.

. Facteurs O soulignés : liés à la conversion phasique (lysogénique)

2.5.4.4 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 O : 9 ;

-Détermination de l'antigène H en opérant par ordre de fréquence des sérovars et en s'aidant du schéma de KAUFFMANN-WHITE. Si, cas le plus fréquent, il s'agit d'un sérovar diphasique, il est nécessaire de déterminer les deux phases de l'antigène H. Si ces deux phases ne sont pas directement agglutinables sur la culture, il faudra sélectionner la phase inapparente en ensemençant une gélose pour essaimage (Sven Gard) additionnée de sérum correspondant à la phase apparente.

Le diagnostic de sérovar sera établi sur la base de l'association du facteur O majeur et des facteurs H. Si la culture appartient à la sous-espèce 1, on trouvera son nom dans le schéma de KAUFFMANN-WHITE en face de la formule correspondante.

La variété antigénique du sérovar identifié pourra être précisée en recherchant l'agglutination dans les facteurs accessoires. [19]

2.6 Nomenclature

Les noms donnés aux salmonelles 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. [13] 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 **Salmonella**. 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 **Bovis morbificans** 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**, **Stanley ville** 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 salmonelles 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.[18] 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 sérovirs seront à l'avenir conservés uniquement pour ceux de la sous-espèce I **Salmonella Typhimurium** ou **Salmonella London**. Au contraire, les nouveaux sérovirs 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, S 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 sérovirs 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 sérovirs comme **Typhi** et qui utilise pour les sérovirs 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. [24]

2.7. Diagnostic biologique

2.7.1. Méthode indirecte :

Le diagnostic indirect permet de détecter dans le sang la présence d'anticorps dirigés contre les constituants des **Salmonella** : les anticorps anti- O et les anticorps anti- H par la méthode d'agglutination sur lame et de dilution du sérum en tube. [9]

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.

Interprétation des résultats

Le sérodiagnostic est un test de présomption au diagnostic des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes 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, dans ce cas les anticorps anti- O peuvent ne pas apparaître et les anticorps anti- H atteignent un taux faible. Parfois, ni les anticorps anti- O ni les anticorps anti- H n'apparaissent. [20]

2.7.2. Méthode directe :

Il faut toujours chercher à isoler le germe au cours d'une salmonellose. Cela permet sa caractérisation précise pour une enquête épidémiologique et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques. [13] Cette technique repose essentiellement sur l'hémoculture et la coproculture.

2.7.2.1. 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 à 1/10^e 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 cerveau.

Bouillon cœur cerveau [32]


Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Caractères recherchés	Résultats
		Introduire quelques gouttes de culture liquide à la pipette Pasteur, ou une gélose de culture solide, dans le bouillon Homogénéiser. Incuber 24 heures à 37°C.	Test Nitrate réductase	Voir NR

Figure n°4 Milieu de mise en évidence de la respiration sur nitrates, par recherche du nitrate réductase (NR).

-Milieux diphasiques

-Hémolysine type castaneda : Trois milieux sont utilisés (gélose sabouraud, gélose Mac Conkey et gélose 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 germes 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} septénaire

75p. 100 pendant le 2^e septénaire

40p. 100 pendant le 3^e septénaire

10p. 100 pendant le 4^e septénaire. [18]

2.7.2.2. 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 Rapapport. Ainsi, les cultures sont faites sur milieux d'enrichissement (Muller Kauffman) et sur milieux d'isolement (Gélose SS, Gélose Hecktoen, ou Mc Conkey). 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 ré-isolement 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 paratyphoïdes, 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 Rapaport [32]



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 Salmonella à l'exception de Salmonella Typhi et Salmonella Paratyphi A-B et C .

figure n°5 : Milieu sélectif d'enrichissement pour la recherche des Salmonelles.

- Milieu Mac Conkey [32]



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 révélé 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⁺ colonies jaunes ou incolores : lactose⁻</p>

figure n°6 : Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram négatif *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques.

- Gélose SS [32]



Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Isolement par la méthode des cadrans.	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	Incuber 18 à 24 h à 37°C.			
				

figure n°7 : 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.

2.7.2.3. 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.

Tableau N°II : Caractères des souches de **Salmonella** typhiques, des *Salmonella* fermentant le lactose sur milieux de culture.

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

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.

2.7.3. Méthodes moléculaires pour la caractérisation des salmonelles

Les méthodes moléculaires peuvent se diviser en deux groupes, celles reposant sur la caractérisation de certaines protéines et celles basées sur la caractérisation du génome, que ce soit à partir de l'ADN plasmidique ou chromosomique. [16]

2.7.3.1. Caractérisation de protéines : l'analyse des iso-enzymes

Le principe de cette méthode repose sur la séparation de protéines cellulaires par électrophorèses en gel d'amidon ou d'acrylamide- agarose et leur mise en évidence par un substrat spécifique.

La migration de la protéine dépend du poids moléculaire et de sa charge électrique et les variations de la migration seront donc directement liées à des modifications dans la structure de la protéine (substitution d'acides aminés), qui est elle-même le reflet de mutations d'ADN au niveau des gènes de structures de ces protéines. [29] On peut ainsi, pour une souche donnée, obtenir une combinaison de variant pour l'ensemble des enzymes étudiées, appelée « type électrophorétique ».

Parmi ces enzymes, les estérases ont été particulièrement étudiées pour les Salmonelles permettant de définir différents « zymotypes » ou profils électrophorétique après migration des estérases. [7]

2.7.3.2. Les marqueurs génotypiques pour la caractérisation des salmonelles

Ces marqueurs sont basés sur l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou plasmidique, et sont de plus en plus utilisés pour de nombreuses espèces bactériennes y compris *Salmonella enterica* ; dans ce cadre précis ils ne s'appliqueront qu'après la détermination au minimum du sérotype de la souche à étudier.

Les techniques basées sur la PCR

Ces techniques permettent de réaliser une amplification génomique de certaines séquences d'ADN choisies de façon judicieuse en fonction du génome. Certaines amorces sont universelles et seront utilisées de façon constante quel que soit le genre bactérien auquel appartient la souche. C'est ainsi qu'un élément répétitif hautement conservé appelé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC) a été décrit et utilisé de façon universelle car les positions des séquences « ERIC » sur le chromosome sont variables selon les espèces et les souches. [8] La technique RAPD pour « Random Amplification of Polymorphic DNA » est une méthode de typage très utilisée et nécessite une seule amorce choisie au hasard, formée d'environ une dizaine de nucléotides et s'hybridant à plusieurs endroits du génome. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche et permettent une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné, [15] mais la reproductibilité et la répétitivité de la méthode sont

passables ce qui ne permet pas de l'utiliser pour un suivi de souches à long terme.

Les techniques PCR ont l'avantage d'être simples à mettre en œuvre et de permettre d'obtenir un résultat très rapidement. Après la phase d'extraction de l'ADN, la PCR est réalisée, suivie de l'électrophorèse des produits amplifiés et de la révélation de ces produits par coloration au bromure d'éthidium (BET) ; l'ensemble de ces étapes est réalisable dans une journée.

2.8. CONTROLE DE L'INFECTION

2.8.1 Epidémiologie

Salmonella Typhi, agent de la fièvre typhoïde, est un germe essentiellement humain. Elle est cosmopolite. La maladie n'est pas endémique en Europe, en Amérique du Nord et en Australie. [23]

Les **Salmonella** sont des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Après la maladie, certains sujets restent porteurs sains et éliminent pendant plusieurs mois des **Salmonella** dans leurs selles. [13] A partir de celles-ci, la contamination, par les « mains sales » peut être, exceptionnellement, interhumaine directe.

Elle est surtout hydrique, les selles souillées ayant accidentellement contaminé les eaux qui sont bues (accidents de canalisation de **Zermatt**, eau de puits à la campagne...).

Elle peut être alimentaire, les aliments ayant pu être souillés par les mains sales ou des eaux, par exemple : crudités arrosées par une eau polluée, contamination par l'ingestion de coquillages, mode fréquent de contamination. Les mouches peuvent servir de vecteurs intermédiaires.

En effet, les matières fécales sont lourdement contaminées : un porteur excrète au moins 10^6 germes viables par gramme de selle. 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 [31] 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...). [6] Les autres **Salmonella** sont responsables d'une infection connue sous divers noms : fièvre paratyphoïde, fièvre entérique et salmonelloses.

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.[25]

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.

2.8.2. 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 Mérieux distribué sous le nom commercial de Typhim- Vi (MC) .Chaque dose unitaire contient 0,5 µg 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 Laboratoires, données inédites) ne recommande pas ce vaccin pour les enfants de 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 anti- corps 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 5ans et 93% à 96% chez des sujets de 5 ans à 45ans (Cannaught Laboratoires, données inédites).

- **Usage recommandé** : Selon les résultats des essais sur le terrain et des études d'immunogénétique, 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 ayant ans. La durée de protection conférée par le vaccin n'est pas bien établie. Le vaccin polysaccharidique maintient une protection immunitaire après 17 mois et 21 mois ; on a noté que les anticorps Vi avaient diminué environ 35% 11 mois après la vaccination et environ 60% après 27 mois. 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 avaient déjà reçu d'autres vaccins 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.

3. Méthodologie de l'étude

3.1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée au laboratoire d'analyses médicales du CHU Gabriel TOURE. Situé à cheval entre la commune II et la commune III du district de Bamako, l'ancien Dispensaire Central de Bamako est devenu le deuxième hôpital national du pays et porte le nom d'un jeune étudiant voltaïque 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, une salle climatisée pour la conservation des réactifs.

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 à - 20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des réactifs de typage 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 : GDH (Labo- CVD);
- 1 microscope Olympus CX31 (Labo- CVD) ;
- 1 néphélométrie 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 étudiants en fin de cycle ;
- 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 Pharmacien microbiologiste et agrégé de bactériologie- virologie responsable de l'Institut Nationale de la Recherche en Santé Publique (INRSP).

3.2. Etude

- Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective de type comparatif.

Elle a été réalisée sur une période de dix sept (17) mois : c'est à dire du 01 janvier 2005 au 09 mai 2006, couvrant toutes les saisons: saison fraîche, saison sèche, saison pluvieuse.

- Population d'étude :

L'étude a concerné les enfants chez qui la recherche bactérienne a été demandée au service de pédiatrie du CVD du CHU Gabriel TOURE.

- Critères d'inclusion

Cette étude a porté 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 16 ans,
- être hospitalisé dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE,
- avoir une température corporelle ≥ 39 °C à l'admission et/ou une "Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive" (SIBI) ;

- le consentement éclairé des parents est sollicité pour les enfants âgés de moins de 13 ans ;
- l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est obligatoire;
- Avoir une hémoculture positive à **Salmonella**.

- Critères de non- inclusion

N'ont pas été inclus dans l'étude :

- les nouveau- nés malades n'ayant jamais quitté l'HGT depuis leur naissance ;
- l'enfant âgé de 13 à 16 ans incapable ou refusant de donner tout assentiment, pas à cause de la gravité de sa maladie;
- les enfants dont le parent ou l'accompagnateur était incapable ou refusait de donner leur consentement.
- hémocultures négatives ou positives à autres germes que **Salmonella**.

3.3. Collecte de données :

Les variables que nous avons utilisées ont été collectées par :

3.3.1. Interrogatoire

L'Age, le sexe, la résidence qui constituent les données sociodémographiques ont été collectées sur la base d'interrogation réalisée par l'équipe CVD au service de pédiatrie.

3.3.2. Analyses de laboratoire

3.3.2.1. 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 cytbactériologique du liquide céphalo-rachidien.

3.3.2.1.1. Traitement des prélèvements de LCR [23]

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 au 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 revenons pour ensemercer 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 meningitidis 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.

3.3.2.1.2. 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.

3.3.2.1.3. Protocole de techniques des hémocultures positives [23]

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 :

- Boîte de gélose au sang de cheval ou de mouton ;
- Boîte de gélose Mac Conkey ;
- Boîte de gélose chocolat ;

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

2. On reporte tous les résultats sur la fiche de travail ;

3. On procède à la lecture de la coloration de Gram :

- Si aucun microorganisme n'est détecté sur la lame de coloration, on remet 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 ;

- Si des microorganismes sont détectés, on ne met plus la bouteille dans le Bactec 9050. On reporte 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 ;

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, on reporte sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. On fait une coloration de Gram sur ces colonies et on reporte 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 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 on fait un test d'oxydase et on inocule une galerie API 20 E. Les Enterobacteriaceae (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase- négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les microorganismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, on confirme le résultat par un test de sérotypage. On enregistre le résultat de ces différents tests ;

9. On procède à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

10. On enregistre le résultat dans le registre de laboratoire et on informe le médecin du patient de l'identification finale.

3.3.2.2. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries [23]

3.3.2.2.1. 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. On utilise une lame propre sur laquelle sont écrits le nom du patient et l'identification du spécimen avec un crayon de papier.

On n'utilise pas de stylo à bille ;

2. On étale l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre afin de permettre au frottis de sécher à l'air libre. On ne doit pas surtout chauffer la lame pour faire sécher rapidement le frottis ;

3. Lorsque la lame est complètement séchée, elle est tenue contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher ;

4. On recouvert le frottis de lame avec le Violet de gentiane pendant 30 à 40 secondes ;

5. On verse le surplus de la solution de Violet de gentiane et on rince la lame avec un jet d'eau faible et ensuite on égoutte l'excès d'eau. On utilise un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;

6. On recouvert le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;

7. On verse la solution de Lugol de la lame et on la rince avec un faible jet d'eau. On égoutte 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, on rince 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. On recouvert le frottis avec la solution de safranine (ou la fuschine basique) pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;

11. On verse 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, on sèche 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.

Bacilles Gram-négatif = Plusieurs micro-organismes : ceux spécifiques aux germes responsables salmonelles sont dits entériques, longs au deux violets foncés.

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

3.3.2.2.2. Tests biochimiques et métaboliques : API 20^E [23]

Le kit de test API-20E pour l'identification de bactéries entériques fournit un moyen facile de lire l'inoculation et les essais aux membres de la famille *Enterobacteriaceae* et les organismes associés. Une bande de plastique tenant vingt mini- tubes à essai est inoculée avec une solution saline de suspension d'une culture pure (selon les instructions du fabricant). Le processus permet de réhydrater chacun des puits avec une suspension bactérienne réalisée avec la solution saline. Certains de ces puits ont des changements de couleur en raison de différences de pH: produire d'autres produits finis qui doivent être identifiés avec des réactifs. Un profil est

déterminé de l'ordre de + et - résultats de l'essai, puis recherché dans un de codes ayant une corrélation entre le nombre et les espèces bactériennes.

OBJECTIF:

En savoir comment effectuer et d'interpréter les miniaturisé, multi-technique d'essais pour l'identification bactérienne.

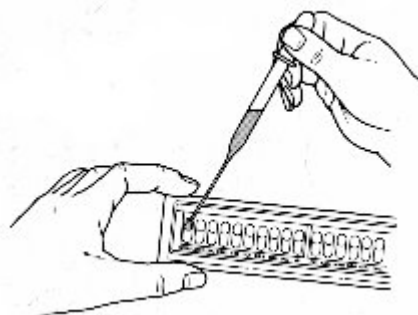
Matériel nécessaire:

Agar de plaques espèces bactériennes,
5ml de solution de NaCl à 0,85%,
Pipettes Pasteur stérile + ampoules
huile minérale stérile,
API 20E bande d'essai (pour oxydase - Gram négatif tiges)
API d'essai d'incubation chambre après incubation: 10% FeCl₃, de Barrett
réactifs A et B, le réactif de Kovac

PROCÉDURE:

Préparer une suspension de la bactérie dans le tube de sel

1. Inoculer une grande colonie (2-3mm de diamètre) de la bactérie (culture pure) dans le 0,85% de NaCl solution, faire en sorte que la suspension soit homogène et sans grumeaux de bactéries flottants.
2. Utilisez un McFarland sulfate de baryum norme n ° 3 en quantité la suspension.



Inoculer l'API Strip

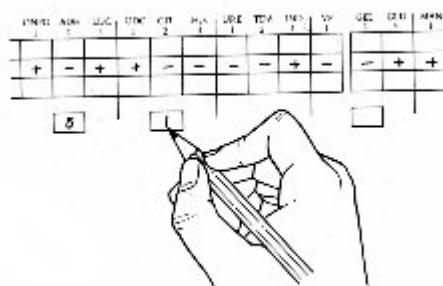
1. En maintenant la bande à un angle légère hausse par rapport à la table, vous allez maintenant inoculer la suspension bactérienne dans chaque puits avec la pipette stérile.

2. Touchez la fin de la pipette sur le côté de la cupule, ce qui permet l'action capillaire de bien tirer dans le liquide comme vous le pressez doucement l'ampoule. Cela devrait éliminer toute formation de bulles dans les puits. Chaque puits doit être rempli jusqu'au cou (voir schéma).
3. CIT, VP et GEL qui ont une case autour de leurs noms. Ces puits d'essai seront bien remplis sur toute la hauteur jusqu'au au sommet.
4. LDC, ODC, ADH, H₂S, et URE sont remplis, comme décrit à l'étape B, mais ils seront ensuite remplis jusqu'au sommet avec l'huile minérale stérile.

Incuber la bande dans sa chambre

1. Le fond de la chambre d'incubation est en retrait de petits puits dans le fond: le remplir avec de l'eau juste assez pour combler ces entailles.
2. Placez la bande en ce bas. Il ne devrait y avoir beaucoup d'eau afin qu'il slops sur l'API bande.
3. Placez le haut de la chambre d'incubation sur le fond, et l'étiquette.
4. Placez la bande à 37 ° C pendant 18-24 heures.

INTERPRETATION:



1. **Ajouter de bons réactifs pour les compartiments:**

- 1 goutte de Kovac's à l'IND (lire dans une couple de minutes)
- 1 goutte de BARRITT A et B de la VP (+ une réaction mai prendre jusqu'à 10 minutes)
- 1 goutte de FeCl₃ à TDA

2. Note en particulier la couleur de réactions **d'acides aminés decarboxylations** (ADH par l'ODC) et de **glucides fermentations** (GLU par ARA).

- Les acides aminés sont testés (dans l'ordre) arginine, lysine et ornithine. **Decarboxylation** est indiquée par une réaction **alcaline** (couleur rouge de l'indicateur de pH utilisé).
 - Les glucides sont testés glucose, le mannitol, l'inositol, le sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, l'amygdaline et arabinose. **Fermentation** est indiquée par une réaction **acide** (jaune couleur de l'indicateur).
3. La production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et la gélatine hydrolyse (GEL) résultent en une couleur noire à travers le tube. Une réaction positive pour le tryptophane désaminase (TDA) donne une profondeur de couleur brune avec l'adjonction de chlorure ferrique; résultats positifs pour ce test en corrélation positive avec la phénylalanine et la lysine désaminase réactions qui sont caractéristiques de *Proteus*, *Morganella* et *Providencia*.

3.3.3. Test de Sensibilité des antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer [23]

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. Les disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des **Salmonella** isolées étaient : l'ampicilline, la ceftriaxone, la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole + triméthoprime et le chloramphénicol. Les résultats ont été présentés en sensible (S), en intermédiaire (I) et en résistant (R).

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)

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 MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les 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 boites 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° C et ensemenecer 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 deux boîtes de gélose pour les 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:

- Pour les bacilles Gram négatif semblables à des entériques
- Boîte de gélose N°1- Ampicilline 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.
- Boîte de gélose N°2- Cotrimoxazole 25 µg, Ciprofloxacine 5 µg.

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

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. On mesure 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.

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.

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

Compte-rendu :

1. On reporte 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 microorganismes 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-organismes

- On reporte comme résistants tous les tests de **Salmonella** et **Shigella** avec des Aminoglycosides et les Céphalosporines de première et seconde générations

3.3.4. Sérogroupage [23]

- 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 typhoïdes et paratyphoïdes, 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 antisérums avec la bactérie à tester.

Les bacilles Gram-négatifs qui sont identifiés comme **Salmonella** (selon le résultat de la galerie API 20E) doivent être confirmées en démontrant leur agglutination avec un anti- sérum spécifique. Ceci est fait en faisant réagir les micro-organismes avec les anti- sérums polyvalents **T, A, B, C** et **Vi**.

Salmonella Typhi réagit avec l'antisérum **T** et avec l'anti- sérum Vi (une capsule thermostable antigénique existe seulement sur **Salmonella Typhi**).

Dans quelques cas l'antigène **Vi** peut bloquer les réactions avec l'anti- sérum **T** (c'est-à-dire, aucune réaction avec l'anti- sérum **T** et agglutination avec l'anti- sérum **Vi**). La bactérie peut être réchauffée pour éliminer l'antigène **Vi** et exposer l'antigène **T** ; cependant on ne réalise pas le test de chauffage.

Salmonella Paratyphi peut réagir avec les anti- sérums **A**, **B** ou **C**.

- Procédure

1. En utilisant une anse stérile, transférer 4 ou 5 colonies bien isolées dans un tube à essai contenant 1ml de solution saline.
2. Mélanger les colonies bactériennes jusqu'à ce qu'une suspension dense soit obtenue, ne contenant pas de grumeaux de colonies bactériennes visibles.
3. Placer une goutte de la suspension bactérienne sur chacune des deux lames.
4. Placer une goutte de l'anti- sérum T polyvalent à côté de la première goutte de suspension bactérienne sur la lame. Placer une goutte de l'anti- sérum Vi à côté de la deuxième goutte de suspension bactérienne.
5. Mélanger chaque pair de gouttes à l'aide d'une anse stérile. Ne pas laisser les deux pairs se mélanger. Alors mouvoir tout doucement d'avant en arrière chacune des lames séparément de manière à bien mélanger les deux gouttes pendant une 1 minute, puis observer pour l'agglutination.

- **Interprétation**

Tableau N°III : Interprétation des résultats du test de sérogroupage de *Salmonella*

T	Vi	Report
Positive	Positive	Salmonella Typhi
Négative	Positive	Salmonella Typhi
Positive	Négative	Réaliser les tests d'agglutination avec les anti-sérums A, B et C
Négative	Négative	Réaliser les tests d'agglutination avec les anti-sérums A, B et C

1. Si l'anti- sérum A, B ou C agglutine, rapporter **Salmonella spp** (pas **Salmonella Typhi**).
2. Si l'anti- sérum A, B et C sont négatifs et l'anti- sérum T et Vi sont négatifs, rapporter le résultat de l'API 20E. Le micro-organisme n'est pas **Salmonella**.
3. Si les anti- sérums A, B et C sont négatifs et l'anti- sérum T est positif, inoculer un bouillon TSI en pente.
 - a. Si le TSI est rouge sur la pente, jaune au fond du tube et avec une petite bande noire formée dans la zone intermédiaire alors rapporter **Salmonella Typhi**.
 - b. Si le TSI est rouge ou jaune avec une large bande noire dans le reste du tube, alors rapporter **Salmonella spp** (pas **Salmonella Typhi**).
 - c. Si le TSI démontre toute autre réaction alors le micro-organisme n'est pas **Salmonella**, répéter le API 20E.

- **Prudences**

1. Uniquement exécuter les examens d'agglutination si la galerie API 20E indique que le micro-organisme est une **Salmonella** parce que d'autres bactéries peuvent réagir avec l'anti- sérum.
- 2- S'assurer de l'utilisation d'une culture pure. Le TSI ne sera pas fiable si une culture mixte est utilisée. [23]

Deux techniques ont été utilisées selon la disponibilité du réactif pour le sérogroupage de **Salmonella**

Le test BIORAD repose sur l'agglutination, par des sérums polyvalents, de bactéries possédant des antigènes correspondants. Les résultats obtenus sur la base de cette technique ont été : **Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi A, B et C.**

Wellcolex* Colour **Salmonella** est un test au latex qualitatif, simple et rapide permettant le dépistage, la détection et l'identification présomptive des sérogroupes de salmonelles dans un bouillon Sélénite F ou sur milieu solide. Les germes révélés **Salmonella** et qui ont été groupées sur la base de cette technique, les résultats ont été les suivants : **Salmonella** du séro groupe **A, B, C, D, E et G**, et de l'antigène **Vi**.

Voir annexe (principes, modes opératoires, interprétations des résultats etc.)

3.4. Traitement informatique des données :

L'analyse des données a été faite avec le logiciel **SPSS 8.0**, le **Word** et l'**Excel** version 2007 ont servi de support pour la saisie des données.

3.5. Aspects éthiques : [33]

3.5.1. Consentement des malades

Des assistants de recherche sont formés à la méthodologie de l'étude, particulièrement à l'obtention du consentement éclairé et à l'inclusion du malade dans l'étude.

Ils travaillent en collaboration avec le tri et les salles de consultations du service Pédiatrie du CHU Gabriel TOURE pendant la durée de l'étude. Chaque pédiatre a à ces côtés un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusion, d'expliquer les modalités de l'étude, objectifs, risques et bénéfices pour l'enfant à la famille et/ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion. Les parents sont approchés dès l'admission ou plus tard dans les 12 heures qui suivent celle-ci. Après avoir obtenu le consentement du malade ou des parents le malade est inclus par l'assistant de recherche dans l'étude. Il est demandé aux enfants âgés de 13-17 ans, d'accord pour participer à l'étude de donner un consentement signé. Cependant, si un enfant extrémis est incapable de donner un consentement éclairé, le consentement des parents suffit pour participer. Toute information que vous fournissez est gardée de Façon **confidentielle** dans des armoires bouclées, bien que les résultats de la

culture soient donnés à votre médecin traitant. Nous, nous engageons à ne pas utiliser les échantillons de sang prélevés pour d'autres recherches, cependant certaines souches de pathogènes pourront être gardées pour des investigations futures.

3.5.2. Inconvénients potentiels de cette étude

Le risque pour les enfants qui participent est faible. Tous les participants sont soumis à une ponction de sang veineux pour l'hémoculture. Cette procédure peut avoir un risque mineur dont la douleur, l'infection et l'hémorragie. A l'admission, beaucoup d'enfants vont subir une ponction sur indication du pédiatre et cette prise complémentaire peut avoir des risques. La procédure d'obtention d'autres liquides stériles d'autres sites (lombaire, pleural, articulaire, tissulaire et osseux) peut avoir des risques comme la douleur, l'infection et la détérioration tissulaire. Ces procédures sont réalisées à la discrétion du médecin traitant et ne sont pas dictées par ce protocole. La culture de ces liquides, qui est prise en charge par l'étude, n'entraîne pas de risque additionnel.

3.5.3. Bénéfices

Sur le plan individuel, les nouveaux équipements en place avec un personnel qualifié permettront une recherche étiologique avancée, telle l'isolement des bactéries par culture, non habituellement utilisés au CHU Gabriel TOURE. Ceci aide, considérablement, le médecin traitant à conduire un traitement étiologique, guidée par un antibiogramme, de la maladie de l'enfant, ce qui est largement important par rapport aux risques mineurs ci-dessus évoqués. Tous les examens biologiques (hémocultures et autres cultures, et antibiogrammes) sont faits gratuitement chez les malades inclus. Le coût moyen de la prise en charge journalière d'un malade est estimé à 25000 Fcfa.

D'une manière générale, cette étude va permettre de relever le niveau, la qualité des prestations au CNAM, au CHU Gabriel TOURE et à l'INRSP par l'amélioration du plateau technique (rénovation des locaux, équipements de laboratoire et de bureau). Aussi, deux techniciens de laboratoire (dont un pour l'HGT et un pour l'INRSP) et un médecin superviseur en pédiatrie ont été formés en microbiologie ainsi qu'à l'usage des nouveaux équipements de

laboratoire. Au terme de l'étude, l'épidémiologie des maladies concernées est mieux connue et des recommandations sont faites en vue d'améliorer leur prise en charge et pour permettre d'autres études dans le domaine de la vaccinologie (introduction de nouveaux vaccins).

3.6. Chronogramme des activités :

De janvier 2005 à mai 2006 : Echantillonnage,

De juin 2006 à décembre 2006 : Rédaction,

De janvier 2007 à octobre 2007 : Interruption,

De novembre 2007 à juin 2008 : Saisie et analyse des données,

De juin 2008 à août 2008 : Rédaction finale.

4. PRESENTATION DES RESULTATS

De janvier 2005 à mai 2006 nous avons analysé 4105 prélèvements d'hémoculture dont 951 ont été positifs.

Parmi les hémocultures positives 185 ont donné des **Salmonella**.

Pendant cette même période 1617 prélèvements de LCR ont été analysés dont 236 positifs parmi lesquels 7 **Salmonella** isolées.

Au total de janvier 2005 à mai 2006, 192 **Salmonella** ont été isolées au laboratoire d'analyses médicales du CVD du CHU Gabriel TOURE et sérotypées par la technique d'agglutination. Ainsi les différents sérotypes et groupes obtenus ont subi les analyses suivantes :

Tableau N°IV: fréquence d'isolement des germes dans les prélèvements d'hémoculture de janvier 2005 à mai 2006.

DESIGNATIONS	Effectif	Pourcentage
Total Bactec	4105	100
Résultats négatifs	3154	76,83
Résultats positifs	951	23,17
Nature des germes isolés		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	233	24,50
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	159	16,72
Salmonella spp	50	5,26
Salmonella Typhi	47	4,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	61	6,41
<i>Escherichia coli</i>	35	3,68
Salmonella Paratyphi B	58	6,10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	0,31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	0,31
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	10	1,05
<i>Streptococcus β- hemolytique</i> groupe A	03	0,31
<i>Enterococcus spp</i>	04	0,42
<i>Morganella morganii</i>	02	0,21
<i>Citrobacter freundii</i>	03	0,31
Salmonella Paratyphi A	03	0,31
Salmonella Paratyphi C	04	0,42
<i>Enterobacter cloacae</i>	06	0,63
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	01	0,10
<i>Proteus mirabilis</i>	01	0,10
<i>Acinobacter baumannii</i>	01	0,10
<i>Acinobacter calcovar</i>	01	0,10
Salmonella du groupe D	23	2,42
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	0,10
<i>Shigella spp</i>	01	0,10
<i>Streptococcus spp</i>	03	0,31
Contaminants :		
<i>Staphylococcus non aureus (SNA)</i>	197	20,71
Bacilles Gram Positif (BGP)	37	3,90
Levures	01	0,10

Tableau N°V : fréquence d'isolement des germes dans les prélèvements de LCR

DESIGNATIONS	Effectif	Pourcentage
Total d'inclusions	1617	100
Résultats négatifs	1381	85,40
Résultats positifs	236	14,60
Nature des germes :		
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	113	47,88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	86	36,44
Salmonella du groupe D	01	0,42
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	10	4,24
<i>Escherichia coli</i>	02	0,85
Salmonella Typhi	01	0,42
<i>Proteus mirabilis</i>	01	0,42
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	01	0,42
<i>Staphylococcus aureus</i>	03	1,27
Salmonella Paratyphi B	05	2,12
<i>Enterococcus spp</i>	01	0,42
<i>Enterobacter agglumera</i>	01	0,42
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	0,42
<i>Flavobacter meningosepticum</i>	01	0,42
Contaminants :		
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	07	2,97
Bacilles Gram Positif (BGP)	02	0,84

Tableau N°VI: Répartition des patients ayant une salmonellose en fonction du sexe.

Sexe	Fréquence	Pourcentage
F	122,0	63,5
M	70,0	36,5
Total	192,0	100,0

Le sexe ratio est en faveur du sexe féminin avec 2 contre 1 pour le sexe masculin.

Tableau N°VII: Répartition des patients souffrant d'infection à *Salmonella* en fonction de l'âge.

Age (en mois)	Fréquence	Pourcentage
00-12	70,0	36,5
13-24	61,0	31,8
25-36	16,0	8,3
37-48	2,0	1,0
49 et +	43,0	22,4
Total	192,0	100,0

La tranche d'âge de 0 à 12 mois a été la plus représentée avec 36,5 %.

Tableau N°VIII: Répartition en fonction de la provenance du patient.

Résidence	Fréquence	Pourcentage
Commune I	29,0	15,10
Commune II	25,0	13,00
Commune III	17,0	8,90
Commune IV	25,0	13,00
Commune V	31,0	16,10
Commune VI	33,0	17,20
Autres (koulikoro et Sikasso)	32,0	16,70
Total	192,0	100,00

La commune VI a enregistré la plus forte fréquence avec 17,20 %

Tableau N°IX: La répartition saisonnière des salmonelloses

Années	2005			2006
	Sèche	Pluvieuse	Fraîche	Sèche
Fréquence	30	53	59	41
Pourcentage	15,62%	27,60%	30,73	21,35

Le pic est maximal à la saison fraîche avec 30,73%.

Tableau N°X : Résultat du sérotypage fait au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel TOURE.

Labo HGT	Fréquence	Pourcentage
<i>Salmonella</i> Paratyphi C	4,0	2,10
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	3,0	1,60
<i>Salmonella</i> Paratyphi B	63,0	32,80
<i>Salmonella</i> groupe D	24,0	12,50
<i>Salmonella</i> spp	50,0	26,00
<i>Salmonella</i> Typhi	48,0	25,00
Total	192,0	100,00

Le laboratoire identifie ***Salmonella* Paratyphi B** avec une fréquence de 32.80% selon le réactif utilisé.

Tableau N°XI : Résultat du sérotypage fait au laboratoire de bactériologie de CVD Baltimore- Université de Maryland (USA).

Labo CVD	Fréquence	Pourcentage
<i>Salmonella</i> Dublin	26,0	13,50
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12,0	6,30
<i>Salmonella</i> Groupe B	30,0	15,60
<i>Salmonella</i> Groupe C	7,0	3,60
<i>Salmonella</i> Groupe D	2,0	1,00
<i>Salmonella</i> Typhi	49,0	25,50
<i>Salmonella</i> Typhimurium	65,0	33,90
Total	192,0	100,00

Tableau N°XII: Résultat de génotypage du genre *Salmonella* identifiés par technique PCR au laboratoire de bactériologie CVD Baltimore- Université de Maryland (USA).

Résultat PCR	Fréquence	Pourcentage
<i>Salmonella</i> Dublin	26,0	13,50
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12,0	6,20
<i>Salmonella</i> not A, B or D	9,0	4,70
<i>Salmonella</i> Stanleyville	24,0	12,50
<i>Salmonella</i> Typhi	49,0	25,50
<i>Salmonella</i> Typhimurium	71,0	37,00
Total	192,0	100,00

Seule *Salmonella* Typhi a été concordant dans toutes les techniques utilisées et a représenté le $\frac{1}{4}$ des souches isolées soit 25,50%.

Profil antibiotypique des *Salmonella* isolées

Tableau N°XIV: la sensibilité des germes à l'Ampicilline

Ampicilline	Fréquence	Pourcentage
R	89,0	46,4
I	0,0	0,0
S	103,0	53,6
Total	192,0	100,0

Tableau N°XV: la sensibilité des germes à la Ceftriaxone

Ceftriaxone	Fréquence	Pourcentage
R	0,0	0,0
I	1,0	0,5
S	191,0	99,5
Total	192,0	100,0

Tableau N°XVI: la sensibilité des germes au Chloramphénicol

Chloramphénicol	Fréquence	Pourcentage
R	83,0	43,2
I	0,0	0,0
S	109,0	56,8
Total	192,0	100,0

Tableau N°XVII: la sensibilité des germes à la Ciprofloxacine

Ciprofloxacine	Fréquence	Pourcentage
R	0,0	0,0
I	0,0	0,0
S	192,0	100,0
Total	192,0	100,0

Tableau N°XVIII: la sensibilité des germes au Cotrimoxazole

Cotrimoxazole	Fréquence	Pourcentage
R	83,0	43,2
I	0,0	0,0
S	109,0	56,8
Total	192,0	100,0

Les résistances ont été notées à l'ampicilline (46,40 %), au chloramphénicol et au cotrimoxazole (43,20 %).

5. COMMENTAIRES ET DISCUSIONS

Les Salmonelles bénéficient aujourd'hui d'une grande variété de marqueurs phénotypiques et génotypiques pour les caractériser. Malgré cette diversité, le sérotypage reste toujours la technique utilisée en première intention.

Le sérotypage 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 antisérums avec la bactérie à tester.

Nous avons identifié 192 souches de **Salmonella** pendant la période de 2005 à 2006.

La fréquence des souches montre une répartition saisonnière avec un pic pendant la saison fraîche. Ce type de répartition est observé dans l'étude de **SADESSI** à la même période en 2004.

L'étude socio- démographique montre :

- Un sexe ratio des patients en faveur du sexe féminin avec 2 contre 1 pour le sexe masculin.
- La tranche d'âge de 0 à 12 mois est la plus représentée avec 36,5 %.
- La commune VI de la ville de Bamako enregistre la plus forte fréquence de salmonelloses avec 17.20 %.

Les souches isolées ont fait l'objet de sérotypage à notre niveau.

Cependant des difficultés techniques existent nécessitant le recours à des laboratoires spécialisés.

Ces difficultés d'ordres logistiques existent surtout dans l'obtention de réactifs de qualité nécessaires aux tests sérologiques.

Finalement, même si les réactifs de typage des antigènes O et H sont disponibles, l'expertise technique exigée et appropriée pour leur mise en œuvre est souvent difficile.

Les résultats de laboratoires spécialisés écartent l'existence de **Salmonella Paratyphi B** parmi les souches identifiées comme telles chez nous.

En revanche ces laboratoires ont trouvé 32.80 % correspondant donc à d'autres **Salmonella** du groupe B comme **Salmonella Typhimurium** ce qui constitue une difficulté majeure de notre laboratoire suite à l'utilisation des réactifs de sérotypage.

D'autres parts le sérotypage ne nous aurait pas permis d'isoler certaines ***Salmonella*** comme ***Salmonella Typhimurium***, ***Salmonella Dublin***, ***Salmonella Stanleyville***.

Les méthodes de biologie moléculaire constituent des méthodes de choix pour la caractérisation des Salmonelles.

Salmonella Typhi a été isolée dans 25,50% des cas par l'ensemble des laboratoires ce qui est confirmé par la biologie moléculaire.

Sur l'ensemble des souches isolées le profil antibiotypique a été le suivant :

Les résistances sont notées à l'ampicilline (46,40 %), au chloramphénicol et au cotrimoxazole (43,20 %) pour chacun.

Seul l'ensemble des germes isolés reste sensible aux fluoro-quinolones dont la ciprofloxacine est largement utilisée.

6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude rétrospective de type comparatif sur le sérotypage des souches de *Salmonella* isolées nous avons constaté, d'une part, que la technique de sérotypage nous a faussement donné une large fréquence de *Salmonella Paratyphi B* (32.80 %). D'autre part, la fréquence de *Salmonella Typhi* (25.50 %) trouvée avec cette même technique a été concordant avec celle trouvée au moyen de techniques de diagnostic moléculaire.

Le sérotypage reste une technique rapide et disponible pour tous les laboratoires de recherche bactériologique pour la surveillance des salmonelloses. Mais les résultats obtenus avec cette technique méritent d'être confirmés par des laboratoires spécialisés au mieux par les techniques de diagnostic moléculaire notamment la PCR.

Au terme de cette étude nous formulons les recommandations suivantes :

Aux biologistes :

- Assurer la disponibilité permanente des réactifs destinés aux différents examens de diagnostic de salmonelloses.
- Former le personnel de laboratoire aux différentes techniques de diagnostic de salmonelloses et l'interprétation des résultats obtenus.

Au ministère de la santé :

- Assurer le bon fonctionnement de la structure technique chargée du contrôle de qualité et des conditions de mise sur le marché de tous les réactifs et articles de santé.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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** : 103-4
- 2- **ASTRUC J, RODIERE M.** Les salmonelloses en pédiatrie méd. Mal. Inf., 1986 ; **16** : 344-9.
- 3- **AZELE F.** Bactériologie à l'usage des étudiants en médecine. Crouan et Roques. Lille, 1970 ; **3** : 170-1.
- 4- **AZELE F.** Bactériologie médicale. La Madeleine : C et D, 1982 ; **12** : 24.
- 5- **BASTIN R, CHARMOT G, FROTTIER J, WILDE JL.** Maladies infectieuses et parasitaires. 2^e ed. Paris : Flammarion, 1981. 66-73.
- 6- **BERCHE P, GAILLARD JL, SIMONET M.** Les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion, 1988 : 77-92 et 572-92.
- 7- **BOUVET E HUBERT B.** Epidémiologie des salmonelloses mineures .Rev. Prat., 1992 ; **42** : 275-8.
- 8- **BRISABOIS A, GOULLET Ph.** Isolation and characterization of carboxylesterase E3 from ***Salmonella enterica***. In *Intérêt et limites des techniques de caractérisation des Salmonella*. Epidémiol. et santé anim., 2001 ; **39** : 31-42
- 9- **CAQUET R.** Guide pratique des examens de laboratoire. Paris 1994 ; **6** :
- 10- **CAVALLO JD, MEYRAN M.** Les Salmonelloses et leur pathologie : base bactériologique du traitement. Med. mal. Inf., 1992; **22** : 331.
- 11- **CRUMP J.A., LUBY S.P., MINTZ E.D.** The global burden of typhoid fever. Bull., World Health Organ., **82** : 346-53.
- 12- **DUTKA-MALEN S, COURVALIN P.** Résistances aux glucopeptides et aux aminosides chez les entérocoques méd. Mal. In 1994; **24** : 158-64.
- 13- **FAUCHERE JL, AVRIL JL.** Bactériologie générale et médicale. Ellipses édition. Marketing S.A. 2002 ; **15** : 247-8.

- 14- **GREVENNA PB, BUENDIA A.** Cambiosen la epidemiologia de la typhoïdea. Salud Pub. Mex., 1973 ; **15** : 839-47
- 15- **HILTON AC, BANKS JG et PENN CW.** ~ Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J.Applied Bacteriol.*, 1996 ; **81** : 575-84.
- 16- **HILTON CS, HIGGINS CF et SHARP PM.** ~ ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 1991; **5** : 825-34.
- 17- **HIRSCHOWITZ B.** Pyogenic liver abscess. Review with a case report of solitary abscess caused by *Salmonella* enteritidis. *Gastro enterology* 1952 ; **21** : 291.
- 18- **LE MINOR L.** Les salmonelles. In : LE MINOR L Bactériologie médicale Paris : Flammarion, 1992 ; 259-74
- 19-**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. Epidemiol. et Santé Pub.*, 1985 ; **33** : 13- 21.
- 20- **LE MINOR L, RICHARD C.** Institut Pasteur de Paris, Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries.
- 21-**LEVY H, DIALLO S, SOW SO, TAPIA M, LIVIO S, TAMBOURA B, et al.** A PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars **Typhi, Paratyphi A** and **B** among *Salmonella* isolates from blood of patients with clinical enteric. *Am., J*, 2007 ; **6** : 3.
- 22- **MARCOU MEURISSE JJ.** Salmonelloses : aspects thérapeutiques. *Med. Mal. Inf.*, 1992 ; **22** : 340.
- 23- **MURRAY P, DIALLO S.** Standard Operating Procedures. Bamako, 2002 ; **1** : 26-7.

- 24- **OMS**. Lutte contre les salmonelles : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits. Série de rapports techniques. Genève : 1988 ; n°774.
- 25- **PECHERE JC, ACAR JF, ARMENGRAND M et al.** Reconnaître, comprendre, traiter les infections. 2è éd Paris : Maloine 1985 ; 279-97.
- 26- **PERELMAN CD et coll.** Infections à *Salmonella* Salmonelloses. Pédiatrie pratique Paris : Maloine s.a Editeur 1977: 103-11.
- 27- **RICHMOND MH**. In: **SATTON M, SAOCKMAN GD** eds. Beta-lactamase antibiotics. Academic press 1981 ; 261-73.
- 28- **ROBBINS JD, ROBBINS JB**. Re- examination of the protective role of the capsular polysaccharide « Vi antigen » of *Salmonella Typhi*. J. Infect. Dis., 1984 ; **150** : 436-49.
- 29-**SADESSI M**. Evaluation du rôle des *Salmonella spp* autres que *Salmonella Typhi* et *Paratyphi A,B* et *C* en milieu pédiatrique à partir des liquides biologique prélevés et examinés au laboratoire de bactériologie du CVD du CHU Gabriel TOURE. Thèse, Pharm, Bamako, 2007 ; **16**.
- 30-**SELANDER RK, CAUGANT DA, OCHMAN H, MUSSER JM, GILMOUR MN et WHITTAM TS**. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematic. In *Intérêt et limites des techniques de caractérisation des Salmonella*. Epidémiol. et santé anim., 2001 ; **39** : 31-42
- 31- **SIMONIN C, BAYLE A, ZURLINDEN A et al.** Epidémiologie des salmonelles isolées au CHU de Miacon de 1980 à1990. Med. Mal. Inf., 1992 ; **22** : 674-7.
- 32 – **GUILLAUME P T**. La microbiologie. In 2004.
- 33- **CAMPBELL JD, KOTLOFF K, SOW SO, TAPIA M, BOUGOUDOGO F, KEITA M et all.** Etude prospective en milieu hospitalier des causes de maladies bactériennes invasives chez les enfants de 0 à 16 ans hospitalisés dans le service de Pédiatrie de l'HGT à Bamako, Mali. An., 2002 ; 4-5.

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : MALLE

Prénoms : Dramane

Titre de la thèse : Typage des souches de **Salmonella** isolées au laboratoire de bactériologie du CVD du CHU Gabriel TOURE de 2005-2006.

Année universitaire : 2007-2008

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.

Mots clés : Typage, Salmonella.

Résumé :

Nous avons réalisé une étude rétrospective de type comparatif sur le sérotypage des souches de *Salmonella* isolées au laboratoire du CVD du CHU Gabriel TOURE de janvier 2005 à mai 2006.

Au total 192 souches de *Salmonella* ont été isolées

Le sérotypage 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 antisérums avec la bactérie à tester.

Les souches isolées ont fait l'objet de sérotypage à notre niveau.

Cependant des difficultés techniques existent nécessitant le recours à des laboratoires spécialisés.

Les résultats de laboratoires spécialisés écartent l'existence de ***Salmonella Paratyphi B*** parmi les souches identifiées comme telles chez nous. En revanche ces laboratoires ont trouvé 32,80 % correspondant donc à d'autres ***Salmonella*** du groupe B comme ***Salmonella Typhimurium*** ce qui constitue une difficulté majeure de notre laboratoire suite à l'utilisation des réactifs de sérotypage.

D'autres parts le sérotypage ne nous aurait pas permis d'isoler certaines ***Salmonella*** comme ***Salmonella Typhimurium, Salmonella Dublin, Salmonella Stanleyville.***

Les méthodes de biologie moléculaire constituent des méthodes de choix pour la caractérisation des Salmonelles.

Salmonella Typhi est isolée dans 25,50% des cas par l'ensemble des laboratoires ce qui est confirmé par la biologie moléculaire.

Sur l'ensemble des souches isolées le profil antibiotypique est le suivant :

Les résistances sont notées à l'ampicilline (46,40 %), au chloramphénicol et au cotrimoxazole (43,20 %) pour chacun.

Seul l'ensemble des germes isolés reste sensible aux fluoro-quinolones dont la ciprofloxacine est largement utilisée.

ANNEXE 1

Technique de BIORAD

Les salmonella sont des bactéries responsables d'infections sévères chez les mammifères et particulièrement chez l'homme. Elles sont une des causes majeures de mortalité infantile dans les pays en voie de développement et constituent un risque permanent dans les pays industrialisés. Les infections à salmonella sont d'une extraordinaire diversité par la multitude des sérotypes en cause et par la variété des syndromes engendrés.

But du test

Les antisérums polyvalents *Salmonella* T, A, B, C sont destinés à l'identification sérologiques présomptive par la méthode d'agglutination sur lame des *Salmonella* le plus couramment isolées d'hémoculture en clinique humaine (chez les adultes) par subculture sur milieu gélosé.

Ces sérums ne doivent pas être utilisés pour les *Salmonella* isolées de coprocultures. Leur emploi est également déconseillé en médecine vétérinaire (à cause de la grande variété des sérotypes, l'analyse antigénique complète est indispensable).

Principe

Le test repose sur l'agglutination, par des sérums polyvalents, de bactéries possédant des antigènes correspondants.

Ces antisérums sont obtenus par immunisation de lapin au moyen de souches de *Salmonella* sélectionnées.

Ils contiennent des agglutines anti-O et anti-H correspondants à *Salmonella Typhi* et *Salmonella paratyphi A, B, C*.

Ils sont dilués à un taux permettant d'obtenir des agglutinations nettes et aussi spécifiques possible.

Les souches de *Salmonella Typhi* en forme V (O inagglutinables riches en antigène Vi), sont souvent très peu mobiles à l'isolement, elles sont donc peu agglutinées par le sérum polyvalent T, mais immédiatement agglutinées par le sérum Vi (agglutination granuleuse).

Mode opératoire

L'identification présomptive de *Salmonella* est effectuée à partir de colonies isolées sur milieu gélosé non sélectif.

Réaliser un contrôle de la souche à tester en eau physiologique :

- Prélever
- Mettre ces bactéries en suspension dans une goutte d'eau physiologique en prenant soin de faire une suspension homogène. Il ne doit pas y avoir d'agglutination, il s'agit d'une agglutination avec l'eau physiologique. S'il y'a agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable et le test avec les antisérums n'est pas réalisable.
- Déposer sur une lame une goutte de chacun des immunsérums.
- Prélever 1 öse d'une culture pure et fraîche de **Salmonella** sur milieu gélosé, de préférence au voisinage de l'eau de condensation. C'est en effet dans la zone la plus humide, que l'antigène H est le mieux développé.
- Mettre ces bactéries en suspension dans chacune des gouttes de sérum en prenant soi de faire une suspension homogène par adjonction progressive des bactéries dans chacun des sérums.
- Agiter la lame par léger mouvement rotatif.
- Observer le mélange à l'œil nu au-dessus d'une surface sombre d'un miroir concave.

Interprétation des résultats

a) Agglutination immédiate et totale

Le germe appartient vraisemblablement à l'espèce qui a servi à préparer le sérum.

Ce cas est le plus fréquent pour les **Salmonella** isolées d'hémocultures.

Les caractères biochimiques permettant de confirmer le diagnostic.

b) Agglutination tardive granulaire de type O

Le germe possède un antigène O commun avec la souche qui a servi à préparer le sérum.

Les deux espèces le plus fréquemment rencontrées sont :

- **Salmonella enteritidis** possédant en commun avec **Salmonella Typhi**, l'antigène O : 9.
- **Salmonella Typhimurium** possédant en commun avec **Salmonella paratyphi B**, l'antigène O : 4 et éventuellement l'antigène O : 5.

L'emploi de sérums anti-H : G (pour *Salmonella enteritidis*) et anti H : i (pour *Salmonella Typhimurium*) permettra une différenciation présomptive.

c) Agglutination partielle, floconneuse du type H

Ce cas est bien plus rare.

Le germe possède un antigène H, commun avec la souche qui a servi à préparer le sérum, mais l'antigène O est différent.

Il faut alors déterminer la formule antigénique complète au moyen de sérums spécifiques.

d) Agglutination avec les 4 sérums (anti T, A, B, C)

Il s'agit vraisemblablement d'une souche rugueuse.

e) Agglutination avec le sérum Vi

Il s'agit vraisemblablement de *Salmonella Typhi* en forme V (O inagglutinable).

ANNEXE 2

La technique de Wellcolex* Colour *Salmonella* selon REMMEL

Définition :

Wellcolex* Colour *Salmonella* est un test au latex quantitatif, simple et rapide permettant le dépistage, la détection et l'identification présomptive des sérogroupes de salmonelles dans un bouillon Sélénite F ou sur milieu solide. Le test Wellcolex* Colour *Salmonella* a été classifié comme hautement complexe selon le CLIA.

Résumé et explication du test

Le genre *Salmonella* est responsable d'un large éventail de maladies chez l'homme, allant de formes bénignes de gastro-entérites à la fièvre typhoïde sévère, voire mortelle ; par ailleurs, l'infection peut revêtir des formes asymptomatiques. Une identification sûre et précoce est donc importante pour la mise en œuvre d'un traitement approprié et le contrôle des épidémies. L'identification minimale des organismes fait appel à des méthodes biochimiques et sérologiques. La détermination sérologique définitive nécessite un vaste panel d'antisérums spécifiques tant des antigènes somatiques « O » que des antigènes flagellaires « H » ; elle est généralement effectuée dans les centres de référence. Il est utile pour le

laboratoire d'identifier l'isolat au niveau du sérotype « O » avant de l'envoyer à un laboratoire de référence.

Principe de la méthode

Pour réaliser le test de Wellcolex* Colour *Salmonella*, utiliser un échantillon de culture en bouillon Sélénite F (incubation de 18 à 24 heures) ou une suspension de bactéries provenant d'un milieu solide avec deux réactifs test chacun constitué d'un mélange de suspensions de particules de latex rouges, bleues et vertes, chacune recouverte d'un anticorps spécifique de différents sérotypes de salmonelles. En présence d'antigène homologue, l'une des suspensions colorées du mélange s'agglutine et l'identité de l'antigène est indiquée par la couleur des particules agglutinées. L'agglutination s'accompagne d'une modification contrastée de la couleur du fond. Chaque combinaison se distingue facilement des autres ainsi que d'un résultat négatif où les particules restent en suspension homogène de couleur gris brun et, de façon occasionnelle, des résultats non spécifiques où les particules s'agglutinent en agrégats gris brun sur un fond éclairci.

Prélèvement des échantillons et préparation des cultures

Le test peut être effectué directement sur des bouillons Sélénite F après incubation de 18 à 24 heures. La qualité du bouillon Sélénite F est primordiale.

Le test peut être également pratiqué sur des colonies ne fermentant pas le lactose poussant en culture primaire sur des milieux sélectifs (par exemple gélose Mc Conkey, gélose entérique Hecktoen ou gélose au xylose, à la lysine et au désoxycholate), en sous-culture de bouillon d'enrichissement sur ces milieux ou en culture pure (par exemple gélose nutritive à plat ou inclinée).

S'il est nécessaire de confirmer les résultats du test, la suspension bactérienne utilisée pour le test coloré peut être remise en culture pour identification ultérieure ; la suspension peut également être utilisée pour l'analyse avec le test Wellcolex* Colour *Shigella* (ZC51/30858401).

Pour de plus amples informations sur le prélèvement des échantillons et la préparation des cultures, se référer à un manuel standard.

Procédure

Préparation du bouillon d'enrichissement

- S'assurer que le bouillon Sélénite F a atteint la température ambiante (18 à 30°C) avant inoculation.
- Inoculer un échantillon de selles de la taille d'un petit pois ou 0,5 ml de selles liquides dans 3 ml de sérum physiologique stérile ou de bouillon Sélénite F dans un tube avec bouchon à vis. Emulsionner en agitant vigoureusement ou en passant au vortex ; s'assurer que les échantillons solides sont préalablement morcelés.
- Laisser reposer pendant quelques minutes afin de réduire le risque de libération d'aérosol. Inoculer le bouillon dans un rapport d'1 volume d'émulsion pour 10 volumes de bouillon puis incuber pendant 18 à 24 heures à 37°C. S'assurer que les flacons et les tubes ne sont pas fermés hermétiquement afin de permettre à l'air de circuler.

Procédure du test

Etape 1 Remettre en suspension les réactifs aux latex 1 et 2 en les agitant vigoureusement pendant quelques secondes. Tenir les flacons verticalement et distribuer en laissant tomber une goutte de chacun des réactifs au latex dans un cercle différent d'une carte de réaction posée à plat. Eliminer les bulles d'air avec l'extrémité du bâtonnet d'échantillonnage.

Etape 2 A l'aide d'un distributeur d'échantillon jetable tenu verticalement, laisser tomber d'elle-même une goutte (40µl) de bouillon Sélénite F inoculé dans chacun des 2 cercles. S'assurer que le bouillon n'a pas été agité lors de sa sortie dans l'incubateur. Il est important de s'assurer que les échantillons de bouillon soient prélevés juste au-dessus du dépôt de débris fécaux en s'assurant qu'aucun débris ne soit prélevé en même temps que l'échantillon. Eviter la formation de bulles d'air. Jeter le distributeur selon les règles de sécurité appropriées.

Etape 3 A l'aide d'un bâtonnet d'échantillonnage, mélanger le contenu de chaque cercle en l'étalant sur toute la surface du cercle. Le même bâtonnet peut être utilisé pour les 2 cercles ; le jeter ensuite selon les règles de sécurité appropriées.

Etape 4 Placer la carte sur un agitateur rotatif à support horizontal et agiter pendant 2 minutes à 150 ± 5 tr/mn. Eteindre l'appareil et observer s'il y'a agglutination **sans retire la carte de l'agitateur**. La carte doit être observée directement d'aplomb, à une distance normale de lecture (25 à 35 cm). **Ne pas utiliser de loupe**. Les motifs utilisés sont bien définis et peuvent être reconnus facilement dans des conditions normales d'éclairage.

En cas de doute sur la présence d'agglutination, le test doit être répété en utilisant une goutte de 40 μ l de bouillon négatif.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination visible. Ce résultat doit être utilisé comme base de comparaison.

Etape 5 Jeter les cercles de réactions utilisés selon les règles de sécurité appropriées. Veiller à remettre les réactifs au latex au réfrigérateur (entre 2 et 8°C).

Identification des colonies

Etape 1 : distribuer environ 200 μ l de sérum physiologique dans un tube à suspension. Il est possible d'utiliser le distributeur d'échantillon jetable qui est gradué à environ 200 μ l.

Etape 2 Après une nuit de culture, prélever avec l'extrémité plate du bâtonnet d'échantillonnage, sur la plaque de culture, 1 ou 2 colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) présumées être des salmonelles et les émulsionner avec précaution dans le sérum physiologique. Si les colonies sont petites, en prélever davantage ; recouvrir l'extrémité du bâtonnet. Jeter le bâtonnet selon les règles de sécurité appropriées.

Etape 3 remettre en suspension les réactifs au latex 1 et 2 en les agitant vigoureusement pendant quelques secondes. Tenir le flacon verticalement et laisser tomber une goutte de chacun des réactifs au latex dans un cercle différent de la carte de réaction posée à plat. Eliminer les bulles d'air avec l'extrémité du bâtonnet d'échantillonnage.

Etape 4 A l'aide d'un distributeur d'échantillon jetable tenu verticalement, laisser tomber une goutte (40 μ l) de suspension bactérienne dans chacun des 2 cercles. Eviter la formation de bulles d'air. Jeter le distributeur dans les règles de sécurité appropriées.

Etape 5 A l'aide d'un bâtonnet d'échantillonnage, mélanger le contenu de chaque cercle en l'étalant sur toute la surface du cercle. Le même bâtonnet peut être utilisé pour les 2 cercles ; le jeter ensuite selon les règles de sécurité appropriées.

Etape 6 Placer la carte sur un agitateur rotatif à support horizontal et agiter pendant 2 minutes à 150 ± 5 tr/mn. Eteindre l'appareil et observer s'il y'a agglutination **sans retire la carte de l'agitateur**. La carte doit être observée directement d'aplomb, à une distance normale de lecture (25 à 35 cm). **Ne pas utiliser de loupe**. Les motifs utilisés sont bien définis et peuvent être reconnus facilement dans des conditions normales d'éclairage.

En cas de doute sur la présence d'agglutination, le test doit être répété en utilisant une goutte de 40 μ l de bouillon négatif.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination visible. Ce résultat doit être utilisé comme base de comparaison.

Etape 7 Jeter les cercles de réactions utilisés selon les règles de sécurité appropriées. Veiller à remettre les réactifs au latex au réfrigérateur (entre 2 et 8°C).

Interprétation :

Résultats négatifs

Aucun réactif au latex ne s'agglutine et l'aspect gris-brun homogène demeure pratiquement inchangé tout au long du test (fig.1). Noter cependant que des faibles traces de granulosités peuvent être détectées dans les motifs négatifs, selon l'acuité de l'opérateur.

Résultats positifs

Un changement de couleur dû à l'agglutination de l'une des suspensions de latex colorées dans le mélange se produit au cours de la réaction induisant un changement contrasté de la couleur du fond (Fig.3 à 5). Généralement, l'agglutination est d'une seule pour un réactif au latex mais, avec une culture mixte de salmonelles, l'agglutination de 2 couleurs pour un réactif au latex (fig.6 à 8) ou d'une seule couleur pour les 2 réactifs peut être observée. Ces diverses possibilités se distinguent sans difficulté. En cas de réactions différentes de celles présentées figures 3 à 8, vérifier et ajuster si nécessaire la vitesse et le fonctionnement de l'agitateur.

Résultats non spécifiques

Toutes les particules s'agglutinent, donnant des amas gris-bruns sur un fond éclairci (fig.9).

Il est possible que quelques amas gris-bruns apparaissent lors d'une réaction positive. Si ceci se produit avec un net changement de couleur au cours du test, il ne faut tenir compte de ces amas gris-brun.

Débris

Dans certains cas, et notamment lorsqu'on teste des bouillons de cultures, des particules granuleuses peuvent être observées dans le mélange réactionnel (fig.2). Elles sont généralement causées par la présence de débris dans le bouillon de culture et se distinguent tout de suite des motifs obtenus en cas de réaction positive ou négative. En cas de doute, tester à nouveau l'échantillon après avoir laissé les débris sédimenter.

Interprétation des résultats

Un résultat positif (agglutination colorée) indique la présence de salmonelles dans l'échantillon et identifie simultanément leur groupe sérologique (ou la présence de l'antigène Vi) selon le tableau suivant

Tableau : des réactions d'agglutinats correspondant aux sérogroupe

réaction	fond	réactif		commentaires pour tests sur bouillon sélénite
		1	2	
		sérogroupe identifie		
Agglutination verte ou olive dans un réactif	Violet/rose	D	A	Les couleurs peuvent variées en fonction de la couleur du bouillon Sélénite. Une réaction positive peut être partiellement masquée par un amas rouge/brun.
Agglutination bleue dans un réactif	Orange/rose	C G	E ou	
Agglutination rouge dans un réactif	Bleu/turquoise	B	Vi	
Amas irréguliers rouge foncé/brun dans les deux réactifs 1 et 2	Gris- brun homogène	Négatif		Ceci est dû aux débris (si un réactif a significativement plus d'agrégats que l'autre, rechercher attentivement les signes de résultats positifs- voir ci-dessous)
Absence d'agglutination	Gris- brun homogène	Négatif		
Agglutination fine, granuleuse, rouge foncé/brun, généralement dans les deux réactifs	Gris- brun clair	Non spécifique		Si la réaction est plus forte dans un réactif, ceci peut être une réaction positive. Analyser soigneusement la couleur. Faire bouillir 0,5 ml d'échantillon comme décrit ci-dessous.
Agglutination turquoise dans un réactif	Rose	C et D	A et E Ou G	Observer soigneusement les couleurs.
Agglutination orange dans un réactif	Bleu	B et D	A et Vi	
Agglutination violette dans un réactif	Vert	B et C	E ou G Et Vi	

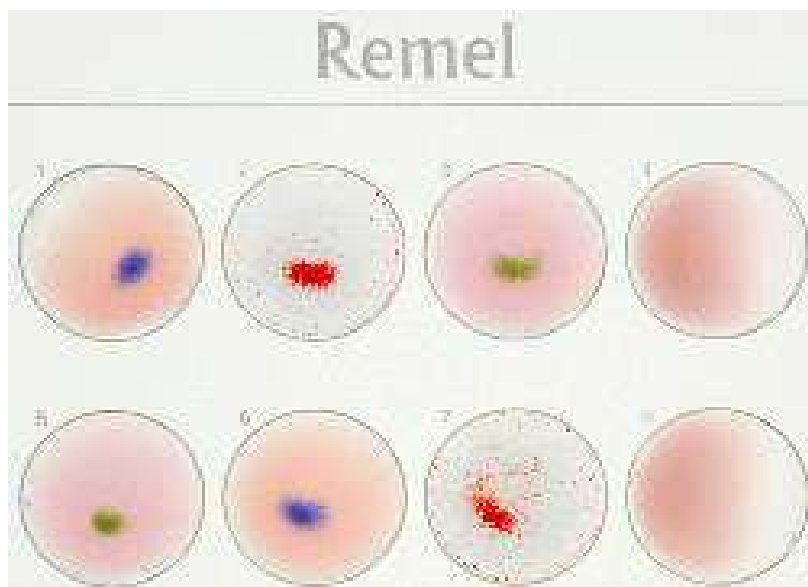


Fig. Test d'agglutination au latex WellCalex Colour Salmonella

Résultats attendus

Les souches appartenant aux sérogroupes A, B, C, D, E et G ou qui possèdent l'antigène Vi donnent une agglutination rouge, bleue ou verte avec le composant correspondant des réactifs au latex 1 ou 2.

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 méprisé de mes confrères si j'y manque

Je le jure.