

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
---SCIENTIFIQUE
Une Foi**

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple - Un But -



*UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO*



U.S.T.T-B

FACULTE DE PHARMACIE

Année Universitaire 2012 – 2013

Thèse N° _____/P

**TYPAGE DES SOUCHES DE SALMONELLA ISOLEES AU
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE CVD DU CHU
GABRIEL TOURE DE JANVIER 2011 A JUILLET 2013.**

THESE

Devant la Faculté de PHARMACIE

Par Mr. TRAORE Sounkarou

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

JURY

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

**Membres : Dr Boubou TAMBOURA
Dr TRAORE Fatoumata DICKO
Dr Aliou TOURE**

Co- directeur : Dr Almoustapha. I. MAIGA

Directeur : Pr Souleymane DIALLO II

DEDICACES

Je dédie cette thèse à :

 **Mon Père** : Sourake TRAORE, infatigable travailleur au service de la famille, ta patience et ton dévouement pour la famille constituent un exemple pour tous. Trouvez ici toute ma gratitude. Qu'ALLAH te récompense papa .

 **Ma Mère** : Sira KANOUTE, ton courage, ton indulgence, font de toi une mère adorable de tous. Trouvez ici toute ma gratitude. Qu'ALLAH te garde très chère maman

 **mes mères Sadio SIDIBE et ASSA SOUCKO**

Je ne trouverai jamais assez de mots pour vous exprimer mon affection, qu'ALLAH vous garde longtemps parmi nous, et Qu'Allah nous accorde belle part ici-bas et belle part dans l'au-delà .Amen

 **MA FEMME MASSIGA SINABA**, toi qui m'as offert ton cœur et toute ta tendresse dans les moments difficiles ; toi qui as fait preuve de compréhension, de patience à mon endroit en tout temps ; reçois cette dédicace comme l'expression de tout mon amour. Qu' ALLAH nous assiste Habibata

 **A mes oncles et tantes**

Ba Lamoko-xoré TRAORE , Ba Balla TRAORE, Ba Boro TRAORE , Ba Modi TRAORE , Ba Salif SIDIBE, , Ba Lamoko junior , Ba Bounassi SIDIBE, Ba Tombo TRAORE , Kama SIDIBE, Diouma , Nana , Bintou , Djitta , TRAORE , Diaba Yaffa , Vous avez de près ou de loin contribué à la réussite de mes études. Qu'ALLAH vous récompense et vous accorde son Paradis .

 **Mes frères et sœurs :** Mamadou dit papa TRAORE, Makan TRAORE, Mahamadou Nana COULIBALY , Maciré TRAORE, Kounadi SIRA TRAORE, Halima SIRA, HAWA SIRA, Samba SIRA, Sira ASSA TRAORE, Hawa Coumba, Kounadi Coumba , Saibou TRAORE, Moussa TRAORE , Maya TRAORE, Tiguida TRAORE, Sira Boro TRAORE, Kaké Modi TRAORE, Hamadi Modi TRAORE,

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

REMERCIEMENTS

A Allah le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux
Que la paix et la bénédiction d'ALLAH soient sur notre prophète Mohamed, sa famille, ses compagnons et quiconque suit sa guidée.

Aux familles

TOURE et COULIBALY à missira, SALL à Kalabancoro, CAMARA à Hamdallaye, Merci pour vos conseils et vos soutiens matériels et moraux.

A mes amis (es) les plus chers

Abdoulaye Sall, Oumar Kalifa et sa femme Awa S Maiga, Abdoulaye Sanogo dit petit Karamoko , Adama Diarra, Lassana Kani Kanouté , Hamadi Diakité , Adam Moueké Koné Imam , Youssouf Mariko petit bouranké , Boukadary Traoré et sa femme Marianne , Kadiatou Djiméga , Neissa Touré , Bakary Koita ,

Certes la meilleure union est celle fondée sur la piété. Qu'Allah ne fasse pas dévier nos cœurs après nous avoir guidés.

A mes camarades de promotion de la FMPOS

Moussa Sanogo , Mamadou Alpha Diallo , Seydou Doumbia dit Papin , Dr Moussa Diawara, Naffissatou Sissoko , Fanta Koita, Dr Koné Adam Camara , Oumar Kalifa , Dr Mamadou Ballo , Dr Croisile Mayap , Djibril Bah , Sorry Ibrahim Fomba , Katilé Bokary

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

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

Qu'ALLAH nous assiste dans nos vies professionnelles

A mes aînés du Laboratoire d'Analyses Médicales de HGT

Drs ; Namory Camara , Allaye Traoré, Hamadoun Maiga, Mme Sanogo
Aichata Sacko, Maimouna Coulibaly

Votre disponibilité, votre amour du travail bien fait, votre esprit scientifique, votre compétence, votre simplicité, m'ont émerveillé durant mon séjour au laboratoire.

Merci pour vos contributions à la réalisation de ce travail.

A mes beaux-frères et belles-sœurs.

A mes cousins et cousines

A tout le personnel du Laboratoire d'Analyses Médicales du CHU GT

A tout le personnel du laboratoire CVD- CNAM, notamment,

Dr Boubou Tamboura, Dr Aliou Touré, Dr Dramane Malla, Dr Aziz, Dr
Tembiné, Dr Mariam , Dr Oumar Traoré,

Merci pour l'expérience acquise auprès de vous .

A tout le personnel du centre de santé de Niamiga :

Au Dr Diallo Deidia Mahamane KATTRA, titulaire de la pharmacie les
HIRONDELLES, j'ai été émerveillé par l'intérêt que vous accordez à
l'encadrement des étudiants.

Votre esprit d'ouverture, votre modestie et votre amour du travail bien fait font de vous un maître inoubliable et hautement respecté.

Trouvez ici l'expression de notre profond respect. Qu'Allah vous accorde belle part ici bas et belle part dans l'au-delà Amen !

A tout le personnel de la pharmacie Les Hirondelles : Dr Ousmane

Coulibaly, Mamadou S Traoré , Mr Youssouf Cissé , Mme Malla Bintou
Coulibaly , Mme Traoré Sokoné Bagayoko, Mr Moumine Traoré, Hamidou
Cissé , Ibrahim Guindo ,

Pour l'atmosphère franche et amicale. Trouvez ici l'expression de mon
Profond respect.

Au Dr DIALLO Tidiane Assistant en Toxicologie à la FAPH

Au Dr SANGARE Samba Adama Assistant en Bactériologie à la FAPH

A tout le corps professoral de la FMPOS

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

A tous mes maîtres depuis le primaire

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

A tous mes camarades de la promotion "**Pr. Souleymane Diallo**".

A mes cadets du service et de la FMPOS

Merci pour le respect et la confiance.

Courage et détermination.

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

Qu'elles en soient remerciées.

En fin nous rendons hommage aux amis qui nous ont quitté prématurément (feux : **Ousmane KONATE** , **Oumar KANE**) après toutes ces années d'études pharmaceutiques, qu'ALLAH leurs accordent sa grâce éternelle. Amen !

Hommages aux membres du jury

A notre Maître et Président du jury

Pr FLABOU BOUGOUDOGO,

- **Maitre de conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la Faculté de Pharmacie ;**

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

Votre dynamisme, votre sens du travail parfait, vos qualités humaines et surtout votre très grande culture scientifique ont forcé notre admiration. Nous espérons avoir fait honneur à vos qualités incontestables de Maître. Nous sommes honorés d'être compté parmi vos élèves. Trouvez dans ce travail toute notre reconnaissance et notre fidèle attachement. Qu'ALLAH vous bénisse. Amen.

A notre maître et juge

Dr TRAORE FATOUMATA DICKO,

- **Maitre-assistant de pédiatrie à la FMOS ;**
- **Responsable de l'unité de néonatalogie dans le département de pédiatrie du CHU-Gabriel Touré ;**
- **Responsable de l'unité PTME au centre d'excellence pour la prise en charge pédiatrique du VIH du CHU-Gabriel Touré.**

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous avons été comblés par votre accueil et votre disponibilité dès notre première rencontre. Nous gardons de vous l'image d'une femme de sciences remplie d'esprit de recherche.

Recevez ici cher maître l'expression de notre profonde considération.

Qu'ALLAH vous garde. Amen

A notre Maître et juge

Dr BOUBOU TAMBOURA

- **Pharmacien Biologiste**
- **Chef de service du laboratoire de recherche CVD-CNAM et CVD-CHU-GT**

Cher maître, nous avons été très impressionnés par la simplicité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail .votre rigueur pour le travail bien fait, votre disponibilité et votre souci pour la formation de vos élèves font de vous un maitre exemplaire. Vos critiques et suggestions ont contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Trouvez, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude et sincère respect.

**A notre Maitre et juge,
Dr ALIOU TOURE**

- **Pharmacien**
- **Superviseur au laboratoire CVD du CHU GABRIEL TOURE**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous avons été comblés par votre accueil et votre disponibilité. Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rempli d'esprit de recherche.

Recevez ici cher maître l'expression de notre profonde considération.

A Notre Maitre et codirecteur de thèse

Dr ALMOUSTAPHA ISSIAKA MAIGA

- **Pharmacien et PhD en virologie à l'école doctorale Complexité du vivant (EdV) de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris 6.**
- **Responsable de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV à SEREFO**
- **Chef de service du laboratoire d'analyses biomédicales du CHU Gabriel Touré.**

Cher Maître

Les mots ne peuvent pas exprimer avec exactitude notre profonde admiration et notre profond respect. Vous nous avez suivi et guidé pas à pas dans l'élaboration de ce travail. Votre rigueur dans le travail, votre dévouement sans limite et votre générosité sont des qualités que nous nous efforcerons d'approcher. Nous sommes aujourd'hui comblés d'une immense joie de vous connaître et d'être votre éternel disciple.

Nous vous remercions, cher Maître, pour la patience dont vous avez eu à notre égard durant toute notre formation.

Recevez ici notre gratitude et notre attachement total.

Qu'ALLAH vous protège. Amen.

A notre Maître et directeur de thèse

Pr SOULEYMANE DIALLO II,

- **Pharmacien biologiste des services de santé des armées**
- **Colonel Major de l'armée Malienne**
- **Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Coordinateur du projet hygiène des mains et sécurité des patients au CHU Gabriel TOURE**
- **Directeur général du centre d'infectiologie Charles Mérieux**

Ce travail est sans doute le fruit de vos efforts. Votre rigueur scientifique, votre esprit d'ouverture et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple à suivre. Soyez rassuré que vos nombreux conseils et enseignements n'auront pas été vains et que nous sommes très fiers d'être compté parmi vos élèves. Nous garderons de vous l'image d'un homme de science d'une extrême ténacité et d'un enseignant soucieux de la formation de ses élèves.

En espérant que cet humble travail saura combler votre attente, veuillez recevoir cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Qu'ALLAH vous donne longue et heureuse vie.

ABREVIATIONS ET SIGLES

ADH : Adénine Déshydrogénase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

API 20 E : Analytical Profile Index

BGN : Bacille Gram Négatif

CHU-GT : Centre Hospitalier -Universitaire Gabriel TOURE

CIT : Citrate

CNAM : Centre National d' Appui à la lutte contre la Maladie

CVD : Center for vaccine development (centre pour le développement des vaccins)

FRU : Fructose

GEL : Gélatinase

GLU : Glucose

H₂S : Hydrogène Sulfureux

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDC :Lysine decarboxylase

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Ortho Nitro Phenyl-Galactopyranosydase

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH: potentiel d'hydrogène

RPM : rotation par minute

S S : salmonella – shigella

TDA : tryptophane désaminase

UFC/ml : Unité Formant Colonie par millilitre

URE : Uréase

VP : Vauges Proskauer

µl : microlitre

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU I : Formules antigéniques des sérotypes de salmonella les plus fréquents
- TABLEAUX II : Exemple d'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix
- TABLEAU III : Réactions d'agglutinats correspondant aux serogroupes
- TABLEAU IV : Répartition des germes isolés des hémocultures
- TABLEAU V : Répartition des germes isolés des prélèvements de LCR
- TABLEAU VI: Répartition des patients souffrant d'infection a *Salmonella* en fonction de l'âge.
- TABLEAU VII : Répartition en fonction de la résidence du patient.
- TABLEAU VIII: Répartition de salmonelles isolées en fonction des sérogroupes.
- TABLEAU IX : Répartition des Salmonelles identifiées par la technique de PCR.
- TABLEAU X : Comparaison de la technique de seroagglutination et de PCR
- TABLEAU XI : La sensibilité des germes à l'Ampicilline
- TABLEAU XII : La sensibilité des germes au cotrimoxazole
- TABLEAU XIII : La sensibilité des germes à la Ciprofloxacine
- TABLEAU XIV: La sensibilité des germes à la Ceftriaxone
- TABLEAU XV : la sensibilité des germes au Chloramphénicol
- TABLEAU XVI : Relation entre sexe et sensibilité des souches aux antibiotiques
- TABLEAU XVII : Devenir immédiat des patients

LISTE DES FIGURES

- FIGURE N°1 : Les *Salmonella* vues au microscope électronique
- FIGURE N°2 : Gélose Mac Conkey
- FIGURE N°3 : Gélose *Salmonella- Shigella*
- FIGURE N°4 : Gélose Hecktoen
- FIGURE N°5 : la P C R
- FIGURE N°6 : Distribution du master mix
- FIGURE N°7 : Photo du gel d'un O grouping
- FIGURE N°8 : Photo du gel d'un H typing
- FIGURE N°9 : Exemple d'une fiche pour la composition du Master Mix
- FIGURE N°10 : Répartition des prélèvements
- FIGURE N°11 : Répartition des patients ayant une salmonellose en fonction du sexe.

TABLE DES MATIERES

1-INTRODUCTION	2
OBJECTIFS :	5
Objectif principal	5
Objectifs spécifiques	5
2-GENERALITES	7
2- 1 Historique.....	7
2-2. Définition et systématique	8
2-3.Habitat	9
2-4.Physiopathologie	9
2-4.1.Pouvoir Pathogène :.....	9
2-4.2.Pathogénie	11
2-5. Caractères bactériologiques	12
2-5.1.Morphologie et Colorabilité	12
2-5.2. Caractères cultureux et milieux de cultures :	12
2-5.3. Caractères Biochimiques	16
2-5.4.Caractères antigéniques	16
2-5.4.1. Antigène du paroi ou antigène O	16
2-5.4.2.Antigène d'enveloppe ou antigène Vi	18
2-5.4.3. Antigène flagellaire ou antigène H :	18
2-5.4.4. Identification d'un sérovars :.....	21
2-6. Nomenclature	22
2-7.Diagnostic biologique.....	24
2-7.1.Méthode directe	24
2-7.1.1. Sang pour hémoculture	24
2-7.1.2.Selles pour coproculture	26
2-7.2. Méthode indirecte	27
2-7.3.Méthodes moléculaires pour la caractérisation des salmonelles	29
2-7.3.1.Caractérisation des protéines : analyses des iso enzymes	29
2-7.3.2. les marqueurs génotypiques pour la caractérisation des salmonelles...30	30
2-8. Traitements	31
2-8.1. Prophylaxie	32
3-Methodologie	35
3-1. Cadre d'étude.....	35
3-2. Type et période d'étude.....	36
3-3 Collecte et analyse des données.....	38
3-3.1. Interrogatoires.....	38
3-3.2 Technique de laboratoire.....	38
3-3.2.1 Protocole technique des hémocultures positives.....	38
3-3.2.2.Techniques utilisées pour l'identification des bactéries	39
3 -3.2.2.1.Coloration de GRAM.....	39

3-3.2.2.2. Tests d'oxydase.....	42
3-3.2.2.3. Tests biochimiques et métabolique : API20E	43
3-3.2.2.4. Tests de sensibilités aux antibiotiques	46
3-3.2.2. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et autres liquides biologiques	50
3-3.2.5. Serogroupage.....	53
3-3.2.6. Typage des souches par PCR	57
3-3.2.6.1. Technique d'extraction de L' ADN des salmonelles	59
3-3.2.6.2. Préparation du mélange mix (le master mix).....	60
3-3.2.6.3. la réaction PCR Proprement dite	62
3-3.2.6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose :.....	66
3.4. Traitement informatique des données :.....	68
3.5. Aspects éthiques :.....	68
3.5.1. Consentement des malades :.....	68
3.5.2. Inconvénients potentiels de cette étude :.....	69
3.5.3.	
Bénéfices :.....	69
4. PRESENTATION DES RESULTATS.....	71
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	85
6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION :

Les salmonelles sont des bacilles aéro-anaérobies Gram négatif, hôtes facultatifs du tractus digestif potentiellement pathogènes pour l'homme et pour les animaux, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. [1]

Le genre *Salmonella* est divisé en deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* (très rare).

Salmonella enterica est divisée en 6 sous-espèces, *S. enterica* subsp. I (subsp. *enterica*), II (subsp. *salamae*), III (subsp. *arizonae*), IIIb (subsp. *diarizonae*), IV (subsp. *houtenae*) et VI (subsp. *indica*). [2]

La sous-espèce I, *S. enterica* subspecies *enterica*, représente plus de 99,5 % des souches isolées en pathologie. L'identification des espèces et sous-espèces se fait sur la base de caractères biochimiques. Au sein de ces espèces et sous-espèces, les souches peuvent être différenciées par la sérotypie (antigènes somatiques O, antigènes flagellaires H et antigènes Vi d'enveloppe) définissant des sérovars ou sérotypes. La dénomination actuelle des sérovars au sein de la sous-espèce est :

- dans la sous-espèce I, par exemple pour le sérotype Typhimurium : *S. enterica* subsp. *Enterica* sérotype Typhimurium ou plus simplement **S. Typhimurium**;
- dans les autres sous-espèces, les sérotypes sont désignés uniquement par leur formule antigénique. La sous-espèce I comprend, à ce jour, 2 435 sérovars.

La contamination est surtout d'origine hydrique. Elle peut être directe (selles, linge souillé, mains sales, urines) ou indirecte (la plus fréquente) par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. [3,4]

Chez l'homme, les salmonelloses sont à l'origine de deux types de pathologie.

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes ou salmonelloses majeures : elles sont dues à **S. Typhi**, **S. Paratyphi** A, B ou C, au cours desquelles deux mécanismes d'invasion se superposent :

Un processus entéro-invasif et l'action de l'endotoxine (LPS). Après une période d'incubation variable (5 à 30 jours, en général 15 jours), la typhoïde comporte deux phases successives :

- l'apparition séquentielle de symptômes pendant la 1^{ère} semaine : asthénie, céphalées, vertiges, signes digestifs (nausées, anorexie), état fébrile qui atteint 40 °C en quelques jours ;
- une phase d'état à la 2^{ème} semaine, caractérisée par une fièvre en plateau à 40 °C, une diarrhée fétide couleur « jus de melon », des signes cutanés, une hépato-splénomégalie, un état de prostration (tuphos), des urines rares et foncées, parfois des signes respiratoires. Si le diagnostic et le traitement sont précoces, l'évolution est favorable. En absence de traitement, on note des complications digestives (hémorragies, cholécystites), cardiovasculaires, neuroméningées et ostéoarticulaires.

Les salmonelloses mineures : elles se traduisent le plus souvent par des gastroentérites d'origine alimentaire dues à **S. Typhimurium**, **S. Enteritidis** et **S. Panama**. En France, 64 % des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont dues aux salmonelles, notamment lors de la consommation d'œufs et de produits à base d'œufs. [3,4]

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, il est reporté annuellement 16,6 millions de cas de fièvre typhoïde, avec approximativement 600 000 cas de décès, et 1,3 milliards de cas de gastroentérites aiguës dues aux salmonelles non-typhiques, avec 3 millions de décès dans le monde. [5]

Dans les pays industrialisés, la plupart des fièvres typhoïdes sont contractées lors d'un voyage à l'étranger. Dans 91% des cas, la fièvre typhoïde a été acquise au cours d'un séjour en zone d'endémie, principalement en Afrique et dans le sous-continent Indien. Cette proportion est de 88% pour les fièvres paratyphoïdes.

Une épidémie a sévi à Kikwit (RDC) en 2011-2012 : 2 065 cas en 13 semaines, 154 complications, 31 décès. [5]

Au Mali , selon l'étude de DIARRA D [6] sur les salmonelloses chez les enfants de 0 à 15 ans , réalisée dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE en 2010 , la prévalence de salmonellose était de 2,70%.

Le serotypage permet d'obtenir la formule antigénique qui désigne un sérovar, seul moyen permettant d'individualiser une variété de *Salmonella*. Il a un intérêt épidémiologique pour déterminer la filiation des cas : soit de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, soit des cas de gastro -entérites alimentaires.

C' est pourquoi nous avons jugé nécessaire de faire le typage des souches de salmonella isolées chez les enfants inclus dans l' étude de surveillance des infections bactériennes invasives du Centre pour le Développement des Vaccins (Center for Vaccine Development) CVD-CHUGT .

OBJECTIFS :

❖ OBJECTIF PRINCIPAL :

Etudier les principaux sérotypes de *salmonella* en comparant les résultats obtenus par la technique de séroagglutination à ceux de la technique de PCR

❖ OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Déterminer la fréquence d'isolement des salmonelles dans les hémocultures, et dans les LCR
- Décrire le profil socio- démographique des patients souffrant de Salmonelloses
- Identifier les sérogroupes et les serotypes les plus fréquemment isolés chez les enfants inclus dans l'étude de surveillance des infections
- Déterminer le taux de conformité des souches isolées par la technique de serogroupage et par celle de PCR

- Déterminer l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches de salmonelles isolées.
- Déterminer le devenir immédiat des patients.

GENERALITES

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 *dothiéntherie*. En 1880, la mise en évidence du bacille dans les coupes histologiques des ganglions des malades morts de fièvre typhoïde a été faite par Eberth.

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

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

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

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

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

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

En 1948, le chloramphénicol a été découvert de même que ses applications thérapeutiques dans les salmonelloses. [7]

2.2. Définition et systématique :

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des ENTEROBACTERIACEAE, bacilles Gram négatifs (BGN), mobiles (exceptés *Salmonella pullorum-gallinarum*), aéro- anaérobies facultatifs, essentiellement des parasites intestinaux des animaux vertébrés ; ils fermentent le glucose avec dégagement de gaz ; lactose négatif (sauf le genre *Arizona*) ; catalase positive ; H₂S positif ; réaction de Vauges Proskauer (VP) négative. Ils sont responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes A, B et C. [8]

Cette famille des entérobactéries comporte actuellement plus de 120 espèces génomiques. Dans le genre *Salmonella*, deux espèces génomiques sont actuellement reconnues : *Salmonella enterica* l'espèce la plus courante qui renferme sept sous-espèces :

- *enterica* (I), *Salamae* (II), *arizona* (IIIa), *diarizona* (IIIb), *houtenae* (IV), *indica* et (VI) *subspecies* (VII)) et *Salmonella bongori* espèce rare.

Ces sept espèces et sous-espèces sont différenciables à l'aide de caractères biochimiques. Les travaux de taxonomie moderne, en particulier les hybridations d'acides désoxyribonucléiques, ont montré que le genre *Salmonella* ne comporte qu'une seule espèce qui comprend elle-même sept sous-espèces facilement différenciables par leurs caractères phénotypiques. Les sous-espèces I, II et IV correspondent respectivement aux sous-genres I, II et IV de Kauffmann. Celles désignées IIIa et IIIb correspondent respectivement aux serovars monophasiques et diphasiques des *Salmonella* du sous-genre III de Kauffmann, qui furent successivement appelées *Salmonella arizona*, groupe «*Arizona* », *Arizona arizonae*, et *Arizona hinshawii*. [9]

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 où des souches de la sous-espèce. Il n'est pas rare 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. [10]

2.3. Habitat :

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

Les *Salmonelles* sont essentiellement des bactéries de l'intestin des animaux vertébrés. [11]

Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par les excréta. 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 [12]

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 [13]

Certains serotypes 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. [14]

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. [15]

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 pathogènes plus étendu notamment **Salmonella Typhimurium**, **Salmonella Enteritidis** et peuvent déterminer des infections chez de nombreuses espèces animales. Ils n'ont pas d'hôtes préférentiels. [14]

Ces serotypes 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. [8]

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. [16]

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. [17]

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. [13]

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 propia* et la sous muqueuse.

Elles induisent des réactions inflammatoires avec afflux de polynucléaires et de macrophages qui phagocytent les bactéries. Les salmonelles gagnent ensuite les ganglions mésentériques, s'y multiplient et se propagent dans la circulation sanguine par le canal thoracique. Ce qui explique les septicémies ; une partie des salmonelles se lyse avec libération d'une toxine qui va irriter le sympathique abdominal provoquant par son intermédiaire l'ulcération des plaques de Peyer. Cette toxine transportée au niveau des ventricules cérébraux provoque l'abattement, le typhos d'où le nom de fièvre typhoïde donnée à cette maladie. [11]

L'évolution spontanée cyclique de la fièvre typhoïde non traitée est devenue aujourd'hui exceptionnelle. [18]

2.5. Caractères bactériologiques :

2.5.1 Morphologie et colorabilité :

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatifs.

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 serotypes aviaires, tels *Salmonella gallinarum* et *Salmonella pullorum* et quelques rares mutants immobiles, les salmonelles sont généralement mobiles avec une ciliature péritriche. [13] voir figure 1 [20]

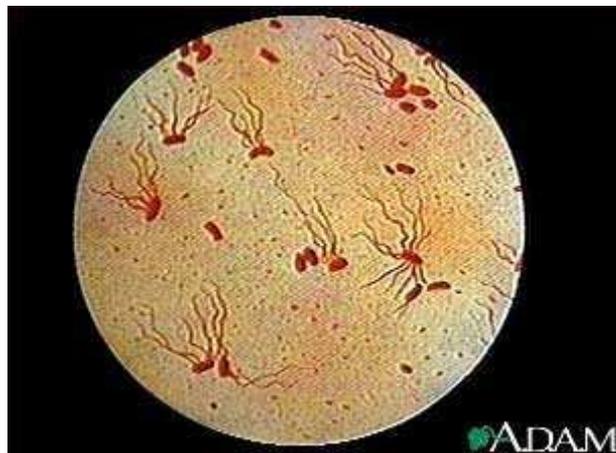


Figure n° 1: Les *Salmonella* vues au microscope électronique.

Source: MICHAEL C. MILONE . Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania M The causative agent of typhoid fever is the bacterium *Salmonella Typhi*. (Image courtesy of the Centers for Disease Control and Prevention) Medical Center, Philadelphia, PA.

Date de consultation : le 15/11/2013

2.5.2. Caractères cultureux et milieux de cultures :

Les milieux sélectifs le plus souvent utilisés pour l'isolement des *Salmonella* sont le milieu *Salmonella- Shigella* (SS), le milieu Mc Conkey et 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*. [8]

L'aptitude à donner des colonies muqueuses est souvent perdue après quelques mois de conservation.

Présentation des milieux de culture :

- Milieu Géluse Mac Conkey :

Pour Salmonella, Shigella autres BGN et Coliformes dans les eaux, les produits alimentaires et biologiques.

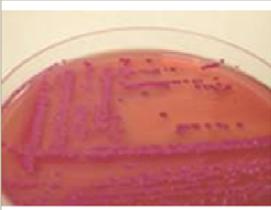
Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Méthode des cadrans. Incubation : 18 à 24 h à 37 °C.	Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram ⁺ : - Sels biliaires - Cristal violet	- Utilisation du Lactose révélée par l'indicateur coloré du milieu le rouge neutre.	Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaires: lactose⁺
Aspect du milieu après utilisation 				Colonies jaunes ou incolores : lactose⁻

Figure N°2 : 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.

Source : GUILLAUME P T. La microbiologie. In 2004.

Date de consultation : le 15/11/2013

Gélose SS :[25]

- Gélose SS

Gélose *Salmonella- Shigella*.

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

Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Méthode des cadrans Incuber 18 à 24 h à 37°C.	3 inhibiteurs :	Fermentation du lactose. Production de H ₂ S à partir du Thiosulfate.	- Colonies rouges :
Aspect du milieu après utilisation		- sels biliaires, - vert brillant - forte concentration en citrate de sodium. Empêchent les bactéries Gram ⁺ , et autres bactéries Gram Négatif autres que <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> .		- Colonies incolores :
				- Colonies à centre noir : H ₂ S +

Figure N°3 : 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.

Source : GUILLAUME P T. La microbiologie. In 2004.

Date de consultation : le 15/11/2013

Gélose Hektoen : [25]

- Milieu Hektoen

Pour Salmonelles, Shigelles et autres BGN.

Aspect du milieu avant utilisation	Mode d'ensemencement	Selectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
	Par techniques habituelles.	2 Indicateurs : - le bleu de bromothymol - la fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde.	Trois glucides : - salicine - saccharose - lactose Production d'H ₂ S	Colonies saumon : <i>Escherichia</i> , <i>Levinea</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i>
Aspect du milieu après utilisation				Colonies saumon à centre noir : <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de <i>Salmonella</i> , à différencier de <i>Proteus mirabilis</i> Colonies bleu-vert ou vertes : Suspicion de <i>Shigella</i> ou de <i>Salmonella</i>
				

Figure N°4 : 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.

Source : GUILLAUME P T. La microbiologie. In 2004.

Date de consultation : le 15/11/2013

2.5.3. Caractères biochimiques :

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 de Simmons positif, Gélatinasse négative, RM positif, VP négatif. [8]

2.5.4. Caractères antigéniques :

Les *Salmonella*, comme toutes les entérobactéries possèdent trois types d'antigènes d'intérêts diagnostiques : Les antigènes de paroi ou antigène O, les antigènes d'enveloppe et les antigènes flagellaires ou H. [15]

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 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. [8].

- **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, ou 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. Le facteur O5 résulte de l'addition d'un radical acétyle sur l'abequose, 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'abequose. 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 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 bi caténaire, 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 par une information codée par un plasmide (cas du facteur O54). [8]

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 **PETIT** 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 serovars 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. [8]

2.5.4.3 Antigènes flagellaires ou Antigènes H :

Les flagelles sont des polymères de flagélline, 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. [8]

Certains sérotypes ont un antigène H mono spécifique : 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 d'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, l'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 : [8]

Mélange O	Groupe	Nom usuel	Antigène O	Antigène H		
				Phase 1	Phase2	
OMA	B	Paratyphi B	1, 4, (5), 12			
		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	1, 4, 12	r	1, 2	
		Coeln	4, (5), 12	y	-	
		Essen	4, 12	g, m	1, 6	
				Abortusovis	c	
OMB	C	ParatyphiC	6, 7 (Vi)	c	1, 5	
		Choleraesuis	6, 7	c	1, 5	
		Isangi	6, 7	d	1, 5	
		Livingstone	6, 7	d	1, w	
		Eimsbuttel	6, 7, <u>14</u>	d	1, w	
		Montevideo	6, 7	g, m, s	-	
		Oranienburg	6, 7	m, t	-	
	C1	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
			Lichtfild	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 %)	Muenster	3, 10	e, h
Anatum	3, 10			e, h	1, 6	
Meleagridis	3, 10			e, h	1,w	
E1	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	-	

2.5.4.4 Identification d'un sérovars :

L'identification d'un sérovars 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 sérovars 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 ensementant une gélose pour essaimage (Sven Gard) additionnée de sérum correspondant à la phase apparente.

Le diagnostic de sérovars 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 sérovars identifié pourra être précisée en recherchant l'agglutination dans les facteurs accessoires. [17]

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.

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 sérovarys.

D'autre part, ces noms étaient mal choisis quand ils laissaient supposer une spécificité zoologique (par exemple les sérovarys **Typhimurium** et **Bovis morbificans** sont ubiquistes), alors que dans d'autres cas ils étaient bien choisis quand il s'agit de sérovarys strictement adaptés à une espèce animale (**Abortusovis**, **Abortuse qui** par exemple). C'est pourquoi, afin de ne plus commettre d'erreur, les noms que l'on continue à donner aux sérovarys 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 commodités : 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. [8]

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 sérovarys seront à l'avenir conservés uniquement pour ceux de la sous-espèce I **Salmonella Typhimurium** ou **Salmonella London**.

Au contraire, les nouveaux sérovarys 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 sérovars de salmonelle n'est certes pas conforme au code de nomenclature des bactéries ni à la nomenclature utilisée pour les autres espèces bactériennes. Elle est un compromis qui a des origines historiques en raison de l'importance médicale de certains sérovars comme **Typhi** et qui utilise pour les sérovars fréquents des noms familiers aux médecins. Il est, pour cette raison médicale, impossible de l'abandonner. Mais il faut savoir qu'un nom de sérovars de Salmonelle n'est pas un nom d'espèce, mais un surnom d'emploi commode donné à un sérovars. [19]

2.7. Diagnostic biologique

2.7.1. Méthode directe :

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

2.7.1.1 Sang pour Hémoculture :

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

-Prélèvement :

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

La décharge bactérienne dans le sang n'étant pas permanente, il est nécessaire

de faire non seulement le prélèvement au moment du pic thermique ou pendant les frissons mais aussi de multiplier le nombre de prélèvement. Ceci permet d'éviter les résultats faussement négatifs.

Le prélèvement doit se faire avant toute antibiothérapie.

-Technique de l'hémoculture :

Le volume à ensemercer :

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

Milieux d'hémoculture :

Différents milieux sont préconisés pour les hémocultures :

Milieux liquides :

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

Transport - Enregistrement - Incubation

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

Surveillance :

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

En cas de positivité, c'est à dire de développement microbien, il faut éliminer un contaminant ou germe de souillure tels que *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnés*, 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 1er septénaire

75p. 100 pendant le 2^e septénaire

40p. 100 pendant le 3^e septénaire

10p. 100 pendant le 4^e septénaire.

2.7.1.2. Selles pour Coproculture :

-Prélèvement – Transport

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

Technique de l'examen bactériologique des selles :

➤ Examen direct :

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

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

Milieux de culture et Ensemencement :

On utilise des milieux sélectifs pour *Salmonella* comme le milieu de Rapaport.

Ainsi, les cultures sont faites sur milieux d'enrichissement (Mueller Kauffman) et sur milieux d'isolement (Gélose SS, Gélose Hecktoen, ou MacConkey).

Ces milieux ensemencés seront placés à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

Au bout de ce temps, on examinera le milieu SS, si les selles contiennent beaucoup de *Salmonella* on aura de nombreuses colonies à centre noir ;

Si les selles contiennent très peu de *Salmonella*, on aura très peu de colonies ou pas du tout ; dans ce cas, on fera un 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 paratyphoïde, on aura de nombreuses colonies caractéristiques.

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

2.7.2. Méthode indirecte :

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

➤ **Principe :**

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

➤ **Technique :**

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

➤ **Evolution des anticorps :**

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

➤ **Interprétation des résultats :**

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

Le sérodiagnostic est un test de présomption au diagnostic des fièvres typhoïde 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.

[10]

TABLEAU II: Exemple d'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix[11]

	1	2	3	4	5	6
TO	100	200	200	100		400
TH	800	-	-	-	400	1600
AO	-	-	-	-		
AH	-	-	-	-	100	100
BO	200	400	-	200	-	200
BH	-	800	-	-	200	200

1. Fièvre typhoïde à la période d'état (coagglutination BO due au facteur 12)

2. Fièvre paratyphoïde B à la période d'état.

3. Possibilité pour: typhoïde au début (avant 10^e jour). A suivre.

- Salmonellose due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella Typhi*.

- Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type IV.

4. Possibilité pour:

- paratyphoïde B au début.

- Salmonellose due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella Paratyphi B*.

- Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type II.

5. Sujet vacciné par le vaccin antitypho- paratyphoïdique A et B (TAB) depuis plus de 3 mois.

6. Fièvre typhoïde chez un sujet vacciné ayant ingéré une grande quantité de Salmonella Typhi addition des cas 1 et 5.

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. [21]

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. On peut ainsi, pour une souche donnée, obtenir une combinaison de variants pour l'ensemble des enzymes étudiées, appelée « type électrophoretique ».

Parmi ces enzymes, les estérases ont été particulièrement étudiées pour les Salmonelles permettant de définir différents « zymotypes » ou profils électrophorétiques après migration des estérases. [12]

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 serotype 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. [22]

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, 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. [21]

2.8. TRAITEMENT :

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

- Avoir une bonne pénétration intracellulaire [13]
- Etre éliminé sous forme active dans les selles par la voie hépatobiliaire et dans les urines pour éviter qu'il subsiste des porteurs de germes [14]
- Avoir une bonne concentration lymphatique mésentérique [14] .

Le traitement des salmonelloses repose sur l'utilisation des :

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

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

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

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

2.8.1. 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 Sanofi Pasteur- distribué sous le nom commercial de Typhim- Vi (MC) .Chaque dose unitaire contient 0,5µg 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.

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 45 ans(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 domestiques 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 atteint l'âge de 2 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.

METHODOLOGIE

3. METHODOLOGIE :

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 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 par le CVD. Elle comprend :

- 2 hottes à flux laminaire ayant incinérateur électrique .
- 3 automates d'hémocultures Bactec 9050 ;
- 1 incubateur à CO₂ pour les bactéries aero- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO₂ pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20E ;
- 1 centrifugeuse ;
- 2 congélateur a - 80 °C pour la conservation des souches bactériennes ;
- 1 congélateur a - 20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des réactifs de typage des *Salmonella* ;
- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs;
- 1 micro- ordinateur avec un système de communication Internet
- 1 microscope Olympus CX31 ;
- 1 néphélométrie Mc Ferland pour la mesure de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de Kirby Bauer ;

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 est composé de :

- un pharmacien biologiste ;
- Trois pharmaciens ;
- des étudiants en fin de cycle ;
- des assistants de biologie.
- des techniciens supérieurs.
- Un personnel de surface.

3.2. Type et période d'étude :

Il s'agit d'une étude transversale descriptive réalisée sur une période de trente et un (31) mois, de janvier 2011 au 31 juillet 2013 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 au 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 le CHU-GT 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'accompagnant 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 constitue les données sociodémographiques ont été collectés sur la base d'interrogation réalisée par l'équipe du CVD au service de pédiatrie.

3.3.2. Techniques de laboratoire :

3.3.2.1. Protocole techniques des hémocultures positives :

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

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

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

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

2. les 3 géloses ainsiensemencés sont placées à l'étuve de même que la bouteille Bactec pendant 18-24h
3. Si des bactéries Gram-négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qui 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 serotypage.

On enregistre le résultat de ces différents tests ;

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

5. On prépare 4 cryotubes contenant glycérol dans lesquelles on gardera les souches de salmonella ainsi identifiées.
6. 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 :

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 microorganismes 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 recouvre 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 recouvre 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 égoutte ;

Note : Si la solution alcool- acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes Gram-positif pourraient apparaître comme Gram-négatif.

10. On recouvre 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 froter 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 chainettes 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. Test d'Oxydase :

Principe :

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

✚ Procédure :

- avec un écouvillon stérile prendre une à deux colonies de bactéries bien isolées dans la boîte de gélose (Ne pas utiliser une gélose Mac Conkey)
- placer 1-2 gouttes d'oxydase sur l'écouvillon.

✚ Interprétation :

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

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

✚ Contrôle de qualité :

Le test d'oxydase est très important pour l'indentification de bactéries Gram négatif. Les bactéries, oxydase- positives, les plus connues sont *neisseria*, *haemophilus*, *vibrio*, et *pseudomonas*. Les bactéries, oxydase- négatifs, les plus connues sont les *enterobacteriaceae*, une grande famille de bactéries qui inclut *escherichia*, *klebsiella*, *salmonella* et *shigella*.

Un test d'oxydase ne peut pas être réalisé avec des colonies de bactéries isolées sur gélose Mac Conkey parce que les colorations dans la gélose pourraient causer une réaction faussement positive.

3.3.2.2.3. Tests biochimiques et métaboliques : API 20 E

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 des *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 recherche dans un de codes ayant une corrélation entre le nombre et les espèces bactériennes.

Matériel nécessaire:

Agar de plaques espèces bactériennes,

5ml de solution de Na Cl à 0,85%,

Pipettes Pasteur stérile + ampoules

Huile minérale stérile,

API 20^E bande d'essai (pour oxydase - Gram négatif tiges)

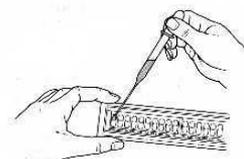
API d'essai d'incubation chambre après incubation: 10% FeCl₃, de Barrett réactifs A et B, le réactif de Kovac

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 Na Cl solution, faire en sorte que la suspension soit homogène et sans grumeaux de bactéries flottants.

2. Utiliser un McFarland sulfate de baryum norme n ° 3 en quantité la suspension



Inoculer l'API 20E

1. En maintenant la bande à un angle léger haut par rapport à la table, vous allez maintenant inoculer la suspension bactérienne dans chaque puits avec la pipette stérile.
2. Toucher 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 sommet.
4. LDC, ODC, ADH, H₂S, et URE sont remplis, comme décrit à l'étape 2, 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. Placer la bande en ce bas. Il ne devrait y avoir beaucoup d'eau afin qu'il s'égoutte sur l'API bande.
3. Placer le haut de la chambre d'incubation sur le fond, et l'étiquette.
4. Placer la bande à 37 ° C pendant 18-24 heures.

INTERPRETATION :

1. Ajouter le réactifs pour les compartiments:

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

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

Les acides aminés sont testés (dans l'ordre) arginine, lysine et ornithine. La **Décarboxylation** est indiquée par une réaction **alcaline** (couleur rouge de l'indicateur de pH utilisé).

Les glucides testés sont : le glucose, le mannitol, l'inositol, le sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, l'amygdaline et arabinose. La **Fermentation** est indiquée par une réaction **acide** (jaune couleur de l'indicateur).

3. La production d'hydrogène sulfureux (H_2S) et l'hydrolyse de la gélatine (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*.

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

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

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

Ne pas utiliser de disques périmés ;

4. Sélectionner au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Toucher le sommet de chaque colonie avec une anse et nous les transférons dans un tube de solution saline. Ajuster l'inoculum de la solution saline à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de

Mac Farland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté;

5. Plonger un écouvillon stérile dans la suspension ajustée.

Il est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. Inoculer la surface entière de la

boite de gélose en faisant tourner la boite d'approximativement d'un angle de 60° C et ensemercer de nouveau.

Faire tourner la boite 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 boites 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 boite 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

- ✓ Gélose 1 : Ampicilline 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.
- ✓ Gélose 2 : Cotrimoxazole 25 µg, Ciprofloxacine 5 µg.

9. On laisse les boites 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 boite.

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'intérieure 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 complété ;
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

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

Les procédures suivantes ont été suivies pour le traitement et l'examen cytotbactériologique du liquide céphalo-rachidien.

✚ Traitement des prélèvements de LCR :

Les prélèvements étaient reçus au laboratoire dans des tubes stériles et étaient 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 étaient réalisés dans l'ordre suivant :

- les boîtes de gélose étaient identifiées (le numéro d'enregistrement, le type de prélèvement, la date de travail étaient écrits) idem pour la lame devant recevoir le frottis ;
- sur les géloses au sang de cheval et ou chocolat 2 à 3 gouttes de LCR étaient déposées puis les boîtes de gélose étaient refermées. Laisser imbiber la gélose par le LCR pendant quelques minutes ;
- une goutte de LCR était déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis;
- après avoir laissé sécher le frottis, il était fixé par "chauffage" de la lame à l'incinérateur de la hotte pendant 5 secondes au maximum ;
- l'hémocytomètre de LCR (cellule de Kova) était rempli et ensuite laissé au repos pour le comptage cellulaire ;
- puis les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur la gélose au sang de cheval ou de mouton ; la gélose chocolat et la gélose Mac Conkey, étaientensemencées. Les boîtes étaient ensuite mises dans l'incubateur à CO₂ en les renversant ;

- les tests d'agglutination avec le sérum latex kit étaient ensuite réalisés, dont le principe était le suivant :

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

Réactif R1 : Latex *haemophilus influenzae* type b

Réactif R2 : Latex *streptococcus pneumoniae*

Réactif R3 : Latex *neisseria meningitidis* groupe A

Réactif R4 : Latex *neisseria meningitidis* groupe B/ *escherichia coli* K1

Réactif R5 : Latex *neisseria meningitidis* groupe C

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

- **procéder à la coloration de Gram :**

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

Les résultats suivants étaient 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.

"Une fiche de travail LCR" était préparée pour y enregistrer le nom du patient, le numéro de dossier et la date du prélèvement. Tous les résultats des tests étaient enregistrés sur cette fiche de travail.

➤ **Protocole de travail de la Culture du LCR :**

- les géloses au sang et au chocolat étaient examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats étaient enregistrés sur la fiche de travail.
- si une colonie bactérienne était observée sur les géloses, une coloration de Gram était effectuée. Les résultats de la coloration de Gram ainsi que la description des colonies étaient enregistrés sur la fiche de travail.

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

- suivre les procédures d'identification pour les cultures positives.

➤ **Résultat de la culture :**

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

Les colonies de *SALMONELLA* après 18 – 24 heures d'incubation à 37°C étaient lisses et mesuraient 2 à 3 mm de diamètre. Des colonies naines s'observaient rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à des colonies de *KLEBSIELLA*.

L'aptitude à donner des colonies muqueuses était souvent perdue après quelques mois de conservation culture la température optimale est de 35 à 37 °C.

3.3.2.5. Sérogroupage :

- **Principe :** Le serogroupage permet d'obtenir la formule antigénique qui désigne unsérovars, seul moyen permettant d'individualiser une variété de *Salmonella*.

Le serogroupage a un intérêt épidémiologique pour déterminer la filiation des cas : soit de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, soit des cas de gastro-entérites alimentaires.

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.

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 serogroupes de salmonelles dans un bouillon Sélénite F ou sur milieu solide.

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 séro groupe« 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 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 sérogroupes 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 ou les particules restent en suspension homogène de couleur gris brun et, de façon occasionnelle, des résultats non spécifiques ou les particules s'agglutinent en agrégats gris brun sur un fond éclairci.

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 :

Mettre dans une cupule appropriée 40U1 de solution saline.

A l'aide d'un cure dent , prendre sur la gélose une colonie bien isolée et suspendre dans la solution saline .

Avec la pipette, mettre une goutte de cette solution dans chacune de deux cercles.

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 utilise 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 tr/mn. Eteindre l'appareil et observer s'il y'a agglutination **sans retirer 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 40µl 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).

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 III: des réactions d'agglutinats correspondant aux serogroupes

Réaction	Fond	Réactif 1, 2 serogroupe identifié
Agglutination verte ou olive dans un réactif	Violet / rose	D A
Agglutination bleue dans un réactif	Orange/rose	C E ou G
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
Absence d'agglutination	Gris- brun homogène	Négatif
Agglutination fine, granuleuse, rouge foncé/brun, généralement dans les deux réactifs	Gris- brun clair	Non spécifique
Agglutination turquoise dans un réactif	Rose	C et D A et E Ou G
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

3.3.2.5 TYPAGES DES SOUCHES PAR LA TECHNIQUE DE PCR :

Principe de la PCR:

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (1) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ; (2) borner et

amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ; (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

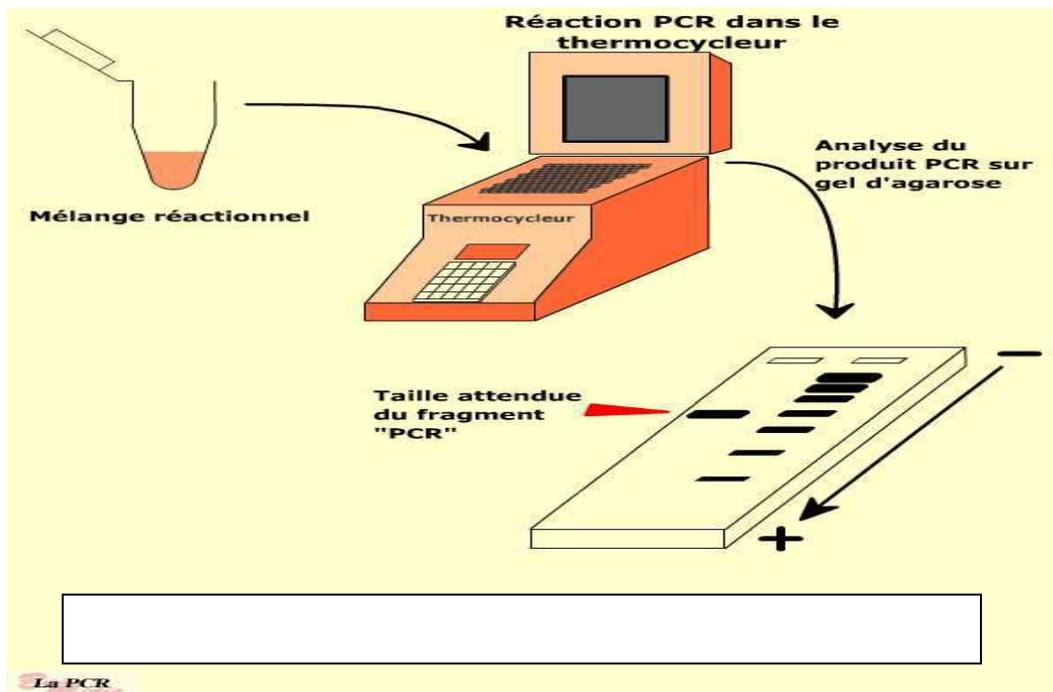


FIGURE N° 5: PCR

Le typage par PCR des souches de salmonella se fait en 4 principaux étapes :

- L' extraction de l'ADN à partir des colonies isolées sur Mac conkey
- La préparation du mélange mixte, le Master-mix
- La réaction PCR proprement dite avec le O grouping et le H typing
- Electrophorèse sur gel d'agarose

3.3.2.5.1-Technique d'extraction de l'ADN des salmonelles :

Matériels :

- Eau ultra pure, anse stérile de 1 microgramme,
- Tube eppendorf de 0,65 ml , thermo-cycleur
- Colonies pur sur MAC, Vortex, Centrifugeuse

procédure :

- Mettre 100 microlitre d'eau ultra pure dans le tube eppendorf 0,65ml
- à partir des colonies fraîches de 18-24 h isolées sur une gélose Mac ou TSA remplir une anse de 1µg de colonies (4 à 5 colonies)
- Suspendre les colonies dans de l'eau ultra pure jusqu' à obtenir une suspension homogène
- La suspension homogène obtenue est ensuite mit à l' ébullition dans le thermo-cycleur (machine à PCR) à 95° pendant 10 minutes
- Ensuite on vortex l'échantillon et on le centrifuge à 12000 RPM pendant 30 secondes
- Le surnageant ainsi obtenu contient de l'ADN

3.3.2.5.2- préparation du mélange réactionnel, le master mix :

Précautions de travail :

En raison de la grande sensibilité de la technique de PCR, des précautions très rigoureuses ont été prises durant la manipulation afin d'éviter les problèmes de contamination (faux positifs). La préparation du mélange réactionnel ``

Mix`` est effectuée dans une salle (cabinet de sécurité) propre (non contaminée par les acides nucléiques). Les réactions post-PCR se sont déroulées dans une autre salle isolée. Le port de gants neufs, d'une blouse propre et l'utilisation de matériel stérilisé (micropipettes, embouts, tubes eppendorf, vortex...) destinés à la salle de PCR, ont été respectés. Toutes les manipulations ont été réalisées dans la glace(pour maintenir la température autour de 4°C).

Procédure :

La première phase de la préparation du master mix sera faite dans un tube eppendorff de 1.5 ou 2 ml , ce mélange contiendra les primers , l'enzyme , le tampon (buffer) de réaction et du MgCl₂. 20µl du mélange sera transférer dans chaque tube de PCR de 200µl .

A la seconde phase 5µl d' ADN des contrôles positifs , du contrôle négatif et des échantillons à tester sera ajouté de façon appropriée dans les tubes et placer dans une machine à PCR .

A la fin de cette réaction les produits PCR seront séparée sur un gel agarose à 2% .

Les produits PCR spécifique déterminera le groupe O, le type H et le d-tartrate que contient les souches à tester

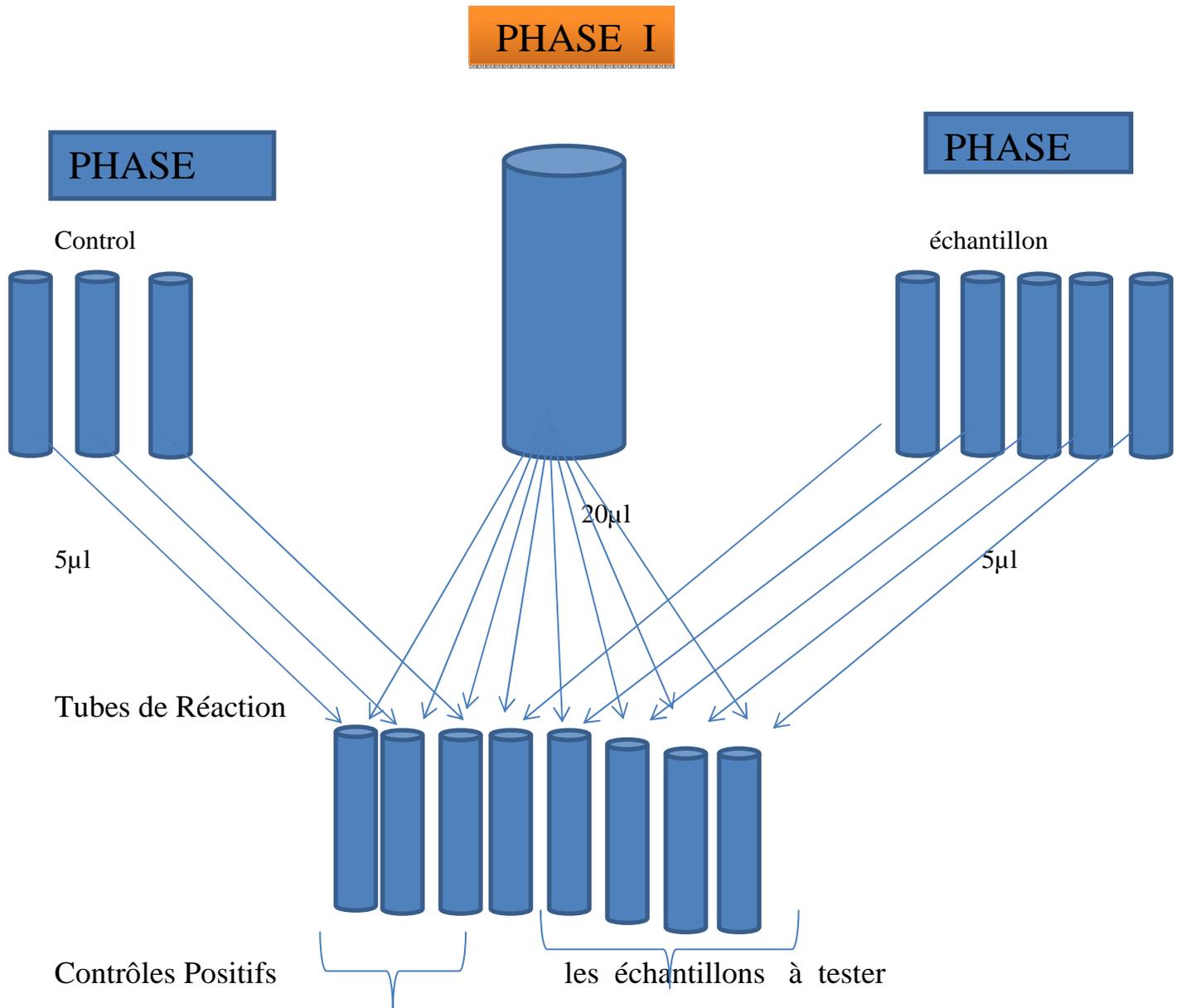


Figure N°6 : Distribution du master mix

3.3.2.5.3-La réaction PCR proprement dite avec le O grouping et le H typing :

O grouping :

- Ouvrir le fichier Excel d' O grouping(voir exemple en figure 3)
- Entrer le nombre d'échantillon à tester
- Entrer 3 contrôle positifs (incluant l' ADN des sérotypes Typhi, paratyphi A, paratyphi B) et 1 contrôle négatif (sans ADN)
- Entrer 2 échantillons de surplus pour 17 échantillons à tester et 3 surplus pour 50 échantillons à tester
- Identifier les tubes de PCR (0,2ml) en écrivant le numéro des échantillons et les tubes des différents contrôles
- Identifier un tube master-mix O : pour un volume total de moins d' 1,2ml on peut utiliser un tube de 1.5 ml , pour les volumes compris entre 1.2 – 1.8ml on utilise un tube de 2 ml
- Préparer le master-mix conformément au fichier Excel , si le volume de l' eau est supérieur à 200 µl utiliser une pipette à volume variable de 200µl mais n' utiliser pas une pipette de 1000µl
- Rassurez-vous que tous vos réactifs sont disponibles à coté avant le démarrage
- Distribuer 20µl de master-mix dans les tubes de la PCR 0.2ml préalablement identifié
- Ajouter 5ul d' ADN au 20ul de master-mix de chaque tube de 0.2 ml rassurer vous que chaque ADN correspondant a été mis dans le tube correspondant
- Pour le contrôle négatif utiliser de l' eau sans ADN (eau ultra pure)

- Placer les tubes de PCR 0.2ml dans la machine de PCR (thermocycleur) fermer la machine en appuyant bien sur la fermeture avec les doigts pour être sûr qu'elle est bien arrivée à niveau .
- Démarrer le programme de pcr O grouping (dénaturation, hybridation , élongation , amplification) .
- A la fin de la réaction procéder à une migration sur gel d' agarose à 2% dans du TAE- buffer .
- Suivre la migration à 100 volts jusqu' à ce que le bleu de bromophénol se déplace d' environ 4 Cm de son site de départ .
- Utiliser un catalogue pour déterminer le O grouping de chaque échantillon

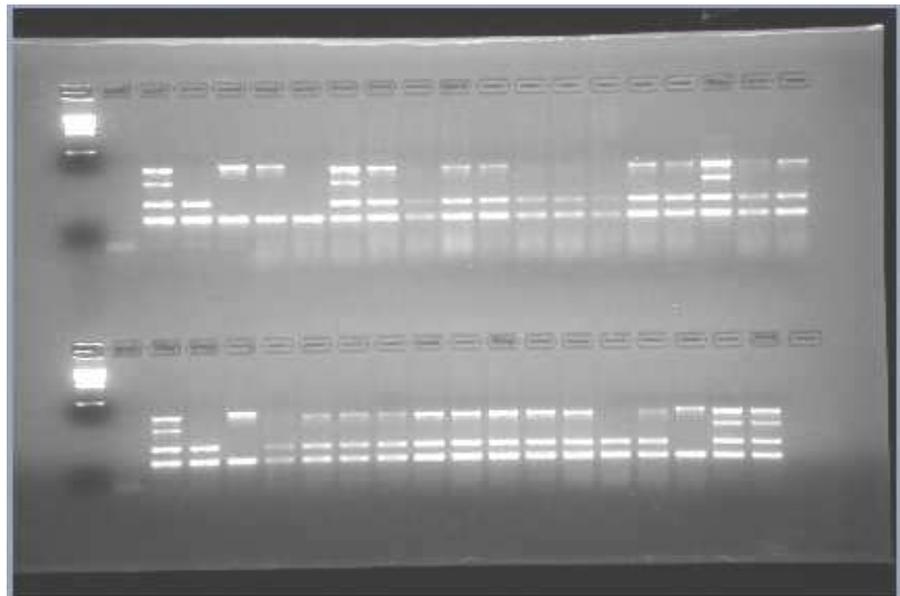


FIGURE N°7 : photo du gel d'un O grouping

H typing :

- Ouvrir le fichier Excel de H typing
- Entrer le nombre d'échantillon à tester
- Entrer 3 contrôles positifs (incluant l' ADN des sérotypes Typhi, paratyphi A, paratyphi B) et 1 contrôle négatif (sans ADN)
- Entrer 2 échantillons de surplus pour 17 échantillons à tester et 3 pour 50 échantillons à tester
- Identifier les tubes de PCR (0,2ml) en écrivant les numéros des échantillons et les tubes des différents contrôles
- Identifier un tube master-mix O : pour un volume total de moins d' 1,2ml on peut utiliser un tube de 1.5ml , pour les volumes compris entre 1.2 – 1.8ml on utilise un tube de 2 ml
- Préparer le master-mix conformément au fichier Excel , si le volume de l' eau est supérieur à 200 µl utiliser une pipette à volume variable de 200µl mais n' utiliser pas une pipette de 1000µl
- Rassurer vous que tous vos réactifs sont disponibles à coté avant le démarrage
- Distribuer 20ul de master-mix dans les tubes de PCR 0.2ml préalablement identifié
- Ajouter 5ul d' ADN au 20ul de master-mix de chaque tube de 0.2 ml rassurer vous que chaque ADN correspondant a été mis dans le tube correspondant
- Pour le contrôle négatif utiliser de l' eau sans ADN (eau ultra pur)
- Placer les tubes de PCR 0.2ml dans la machine de PCR (thermo-cycleur) fermer la machine en appuyant bien sur la fermeture avec les doigts pour être sûr qu' elle est bien arrivée à niveau .

- Démarrer le programme de PCR H typing (dénaturation, hybridation, élongation, amplification).
- A la fin de la réaction procéder à une migration sur gel d'agarose à 2% dans du TAE- buffer.
- Suivre la migration à 100 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol se déplace d'environ 4 Cm de son site de départ.
- Utiliser un catalogue pour déterminer le H typing de chaque échantillon

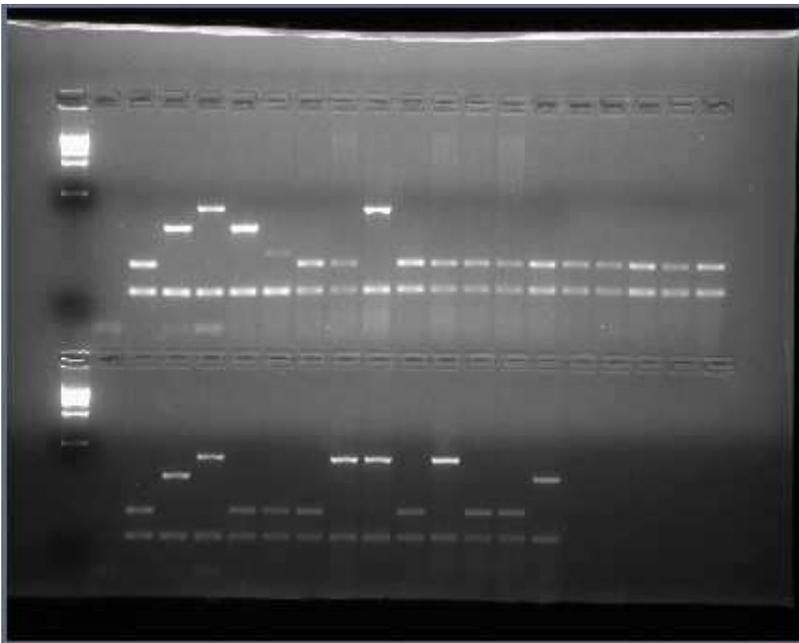


FIGURE N°8 : Photo d'un H typing

3.3.2.5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose :

+ Préparation du gel (moulage) :

Une solution d'agarose à 2% (Agarose Ultra-pure, Bio-Rad) est préparée dans du TAE 1X, chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à 60°C. L'agarose est ensuite coulée dans un moule monté sur cassette munie d'un peigne à 15 à 20 cupules. Après polymérisation, les peignes sont retirés et le gel est immergé dans un bain de TAE 1X.

+ Dépôt des échantillons :

Un volume de 1µl du tampon de chargement (bleu de bromophénol, glycérol et H₂O) est additionné à 10µl de chaque produit d'amplification. Ensuite, les marqueurs de poids moléculaire (1 Kbp ou 100bp) sont déposés dans les premiers puits du gel.

+ Migration :

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 100 Volts pendant 25 -30 minutes. Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration atteint les trois-quarts de la longueur du gel.

+ Visualisation :

Le gel est immergé dans une solution de Bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml pendant 15 minutes. Après lavage à l'eau distillée pendant 15 minutes, le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV et photographié à l'aide d'un appareil geldoc.

Figures N°9: Exemple d'une fiche EXCEL pour la composition de O grouping Master Mix

Réactions	9	<input type="text"/>	nombre d'échantillon :	<input type="text"/>
10x Buffer	22.5	<input type="text"/>	contrôle positif	3 <input type="text"/>
2mMdNTPs	22.5		contrôle négatif	<input type="text"/>
50 mMMgCl	15.75		échantillon supplémentaire:	<input type="text"/>
Enzyme	1.8			<input type="text"/>
Primer Mix	9			
DdW	108			
Total volume :	179.55			

Matériels et équipements :

Dispositifs :

Tube ependorff 1.5ml , Tube ependorff 0.5 ml , Tube pcr 0.2ml

Réactifs :

Taq AND polymerase (in vitron) , Dntp , 50mM MgCl₂ , DdH₂O PCR grade , Agarose , TAE ou TBE buffer Bromure d' éthidium , ADN loading dye diluted 1:50 in 30% glycerol

Equipements :

Machine de PCR , Mini centrifugeur , Pippettes de 20µl n 200µl

Primers :

O serogrouping primers , H typing primers , D tartrate fermentation primers , Control interne primers

Suite à la prise anarchique des antibiotiques, certaines salmonelles ont subi une mutation qui se traduit par la perte de l'antigène flagellaire.

Ces salmonelles se sont révélées pathogènes mais ils n'étaient pas détectables par les différentes amorces qu'on utilisait.

C'est pourquoi deux nouvelles amorces *fliA* et *fliB* ont été ajoutées à la gamme d'amorce pour couvrir ces salmonelles mutants.

F *fliB* (5'-CTGGCGACGATCTGTCGATG-3')

R *fliA* (5'-GCGGTATACAGTGAATTCAC-3')

La souche atypique de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* *fliB*-Négatif du serovar 4,5,12 :i semble être une variante monophasique de serovar typhimurium.

Le serovar *Salmonella enterica* 4,5,12 :i :-phage type DT U302 multi résistant (résistant à l'ampicilline, le chloramphénicol, les sulfamides, la gentamicine, la streptomycine, la tétracycline et le sulfaméthoxazole-triméthoprime) a émergé et s'est propagé en Espagne en 1997.

Les séquences spécifiques au *Salmonella* serovar Typhimurium et le phage type DT104 et U302 étaient présentes chez cette souche de salmonelle atypique, ce qui suggère qu'il s'agit d'une variante de *Salmonella* serovar Typhimurium monophasique. Les souches de salmonelles monophasiques pourraient être des formes ancestrales qui n'ont pas acquis un second antigène flagellaire ou le mécanisme de commutation nécessaire au cours de l'évolution.

Toutes les souches non mobiles 1,4, 12 : avaient le *fliC*, *fliA*, *fliB* et les gènes *hin* ; et le gène *fliC* a été détectée chez 88% des souches monophasiques.

Le programme de PCR impliquait une dénaturation initiale à

94° C pendant 5min, suivie de 30 cycles de

94°C pendant 30 s, 64°C pendant 30 s et 72°C pendant 90 s, et une élongation finale à 94°C pendant 10 mn

3.4. Traitement informatique des données :

L'analyse des données a été faite avec le logiciel **SPSS 18.0**, le **Word** et l'**Excel** version 2010 ont servi de support pour la saisie des données.

3.5. Aspects éthiques :

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 est accompagné d'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 13-16 ans, l'accord pour participer à l'étude et 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 utilisées 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. D'une manière générale, cette étude va permettre de relever le niveau, la qualité des prestations au CNAM et au CHU Gabriel TOURE par l'amélioration du plateau technique (rénovation des locaux, équipements de laboratoire et de bureau).

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).

Chronologie des activités :

De Décembre 2012 à Mars 2013 : Revue de la littérature

De Mars 2013 à Juin 2013 : élaboration et validation du protocole

De Juin à Aout 2013 : Typages des souches par la PCR au CNAM

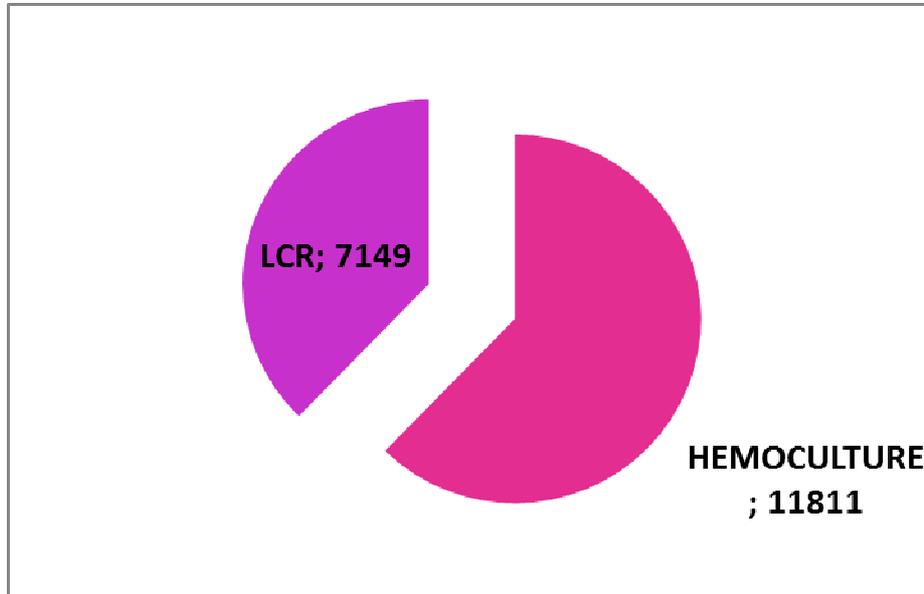
De Septembre à Novembre 2013 : Saisie et analyse des données,

De Novembre 2013 à Janvier 2014 : Rédaction finale.

RESULTATS

4- RESULTATS :

FIGURE N°10: REPARTITION DES PRELEVEMENTS



De janvier 2011 au 31 juillet 2013 nous avons analysé 11811 (62,30%) prélèvements d'hémoculture dont 1203 ont été positifs. Parmi les hémocultures positives 198 ont donné des *Salmonella*

Pendant cette même période 7149(37,70%) prélèvements de LCR ont été analysés dont 333 positifs parmi lesquels 12 *Salmonella* isolées.

TABLEAU N°IV: Répartition des germes isolés des d'hémoculture de janvier 2011 à Juillet 2013.

Natures des germes isolés	Effectif	Pourcentage
<i>Staphylococcus aureus</i>	98	8,14
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	299	24,85
<i>Neisseria méningitidis</i> W135	67	5,57
Salmonella spp	16	0,49
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	2,33
<i>Escherichia coli</i>	31	2,57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	1,08
<i>Pseudomonas spp</i>	1	0,08
<i>Enterobacter agglomera</i>	3	0,24
<i>Morganella morganii</i>	1	0,08
<i>Citrobacter freundii</i>	4	0,33
<i>Streptococcus β- hemolytique</i> groupe A	14	1,16
<i>Acinobacter calcovar</i>	4	0,33
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	4	0,33
<i>Haemophilus para influenzae</i>	3	0,24
Salmonella groupe C	3	0,24
<i>Edwarsiella</i>	1	0,08
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	0,33
<i>Streptococcus</i> groupe B	1	0,08
Salmonella E OU G	3	0,24
<i>Shigella spp</i>	5	0,41
<i>Pseudomonas cepacia</i>	10	0,83
Salmonella groupe A	1	0,08
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0,16
<i>Streptococcus spp</i>	3	0,24
<i>Achromonasxyloxi</i> dan	4	0,33
Salmonella groupe D	138	11,47
Salmonella Typhi	14	1,16
Salmonella groupe B	23	1,91
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	56	4,65
<i>Enterococcus spp</i>	25	2,08
Contaminants :		
<i>Bacille gram positif</i>	82	6,81
<i>Staphylococcus non aureus</i>	244	20,28
Levures	8	0,66
Total	1203	100

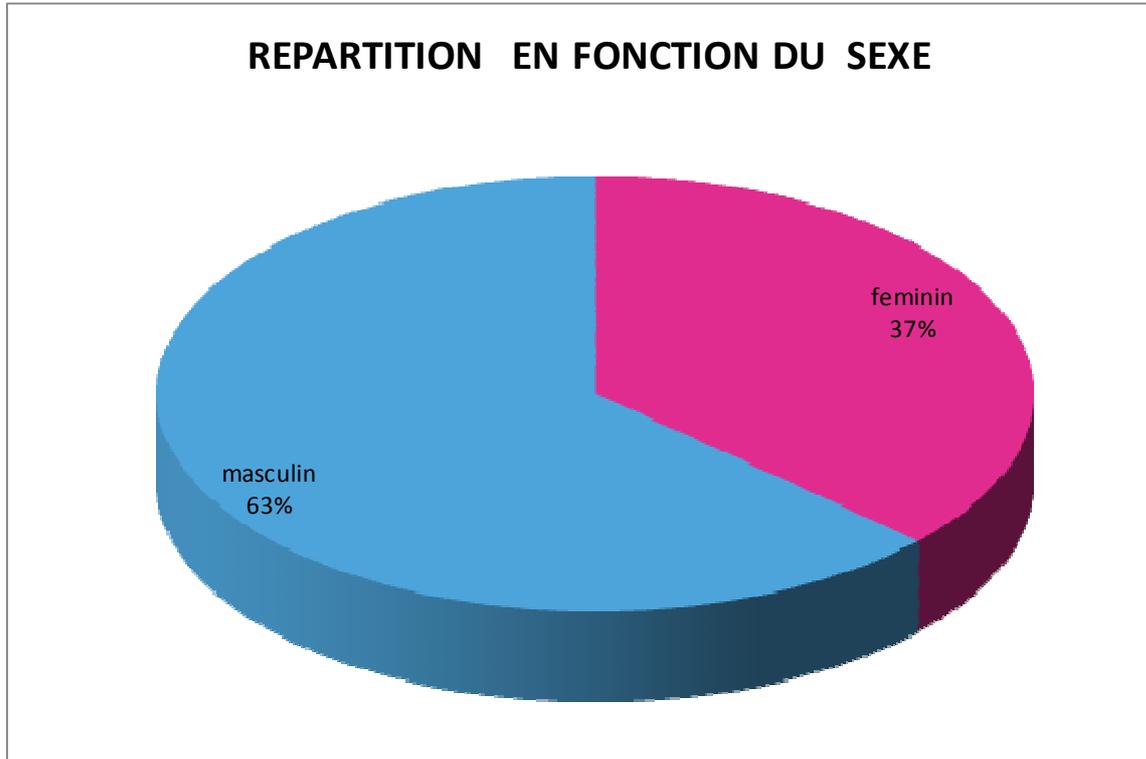
La fréquence d'isolement des salmonelles dans les hémocultures a été de 1,68%

TABLEAU N°V: Répartition des germes isolés dans les prélèvements de LCR

Nature des Germes isolées	Effectif	Pourcentage
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	0,29
<i>Streptococcus</i> du groupe B	02	0,59
<i>Streptococcus</i> du groupe A	01	0,29
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	146	43,58
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	33	9,85
<i>Enterococcus spp</i>	07	2,08
<i>Proteus mirabilis</i>	01	0,29
<i>Moraxella spp</i>	02	0,59
<i>Citrobacter</i>	02	0,59
<i>Escherichia coli</i>	03	0,89
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	110	32,83
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	03	0,89
Salmonella groupe D	07	2,08
<i>Acinetobacter</i>	01	0,29
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	02	0,59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	0,59
Salmonella spp	04	1,19
Salmonella E OU G	01	0,29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	0,89
Contaminants :		
<i>Staphylococcus non aureus</i>	02	0,59
Bacille gram positif	02	0,59

La fréquence d'isolement des salmonelles dans les LCR a été de 0,17%

FIGURE N ° 11: Répartition des patients ayant une salmonellose en fonction du sexe.



Le sexe ratio est de 1,71

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

Age (en mois)	Effectifs	Pourcentage
[0 -1[5	2,5
[1 – 12[58	29,3
[12 – 48[105	53,0
[48 – 192[30	15,2
Total	198	100

La tranche d'âge 12-48 mois a été la plus représentée avec 53 %.

TABLEAU N°VII: Répartition des patients en fonction de la résidence.

Résidence	Effectif	Pourcentage
Commune I	20	10
Commune II	25	13
Commune III	16	8
Commune IV	32	16
Commune V	28	14
Commune VI	14	7
Hors BKO	63	32
Total	198	100

32 % des patients résidaient hors de Bamako .

TABLEAU N°VIII: Répartition de salmonelles isolées en fonction des sérogroupes.

Serogroupes	Effectif	Pourcentage
Salmonella Paratyphi A	01	0.05
Salmonella Paratyphi B	23	12
Salmonella Paratyphi C	03	1.5
Salmonella groupe D	138	70
Salmonella spp	16	8
Salmonella Typhi	14	7
Salmonella groupe E ou G	03	1.5
Total	198	100

Nous avons identifié **Salmonella groupe D** avec une fréquence de 70%.

TABLEAU N°IX: Répartition des **Salmonelles** identifiés par la technique de PCR.

serotypes	Effectif	Pourcentage
Salmonella Dublin	21	10 ,61
Salmonella Enteritidis	129	65,15
Salmonella not A, B, or D	8	4,04
Salmonella Typhi	12	6,06
Salmonella Typhimurium	21	10,61
Salmonella paratyphi A	1	0 ,50
Salmonella paratyphi B	4	2,02
Salmonella groupe D Vi⁻	2	1,01
Total	198	100

Nous avons identifié *Salmonella Enteritidis* avec une fréquence de 65,15%

TABLEAU N°X : comparaison des résultats de la technique de séroagglutination à ceux de la technique de PCR

Sérotypes	T. de séro-agglutination	Technique de PCR	% de concordance
Salmonella paratyphi A	1	1	100%
Salmonella paratyphi B(Typhimurium)	23	25	92%
Salmonella paratyphi C	3	00	00%
Salmonella groupe D(enteritidis , Dublin)	138	152	90,8%
Salmonella Typhi	14	12	85,7%
Salmonella spp	16	08	50%
Salmonella E ou G	3	00	00%

Les 2 techniques ont été concordants dans l'identification de salmonella paratyphi A

Profil antibiotique :

TABLEAU N°XI: la sensibilité des germes à l'Ampicilline

Ampicilline	Effectif	Pourcentage
Résistants	163	82,3
Sensibles	35	17,7
Total	198	100

82,3 % des souches de salmonella étaient résistant à l'Ampicilline

TABLEAU N°XII: la sensibilité des germes au Cotrimoxazole

Cotrimoxazole	Effectif	Pourcentage
Résistants	86	43,4
Sensibles	112	56,6
Total	198	100

Les souches de salmonella étaient sensibles au cotrimoxazole avec une fréquence de 56,6%

TABLEAU N° XIII: la sensibilité des germes à la Ciprofloxacine

Ciprofloxacine	Effectif	Pourcentage
Résistants	5	2,5
Sensibles	193	97,5
Total	198	100

La plus part des souches de salmonella étaient sensible avec une fréquence de 97,5%

TABLEAU N°XIV: la sensibilité des germes à la Ceftriaxone

Ceftriaxone	Effectif	Pourcentage
Résistants	8	4
Sensibles	190	96
Total	198	100

96% des souches de salmonella étaient sensible au ceftriaxone

TABLEAU N°XV: la sensibilité des germes au Chloramphénicol

Chloramphénicol	Effectif	Pourcentage
Résistants	145	73,2
Sensibles	53	26 ,8
Total	198	100

73,2% des souches étaient résistantes au chloramphénicol

TABLEAU N°XVI: devenir immédiat des patients

Etat	Effectif	Pourcentage
Amélioré	131	66
Décédé	38	19
Non amélioré	14	7
Amélioré avec séquelles	2	1
Perdue de vue	13	6
Total	198	100

66% de patients ont eu une amélioration de leur infection selon les signes cliniques après le traitement

**COMMANTAIRES
ET
DISCUSSION**

5- COMMANTAIRES ET DISCUSSION :

1-Difficultés et limites :

La coproculture n'a pas été effectuée chez les patients ce qui a beaucoup influencé notre résultat, qui aurait pu nous permettre de retrouver des germes potentielles.

Le traitement antibiotique avant la consultation a sous estimé l'ampleur de ces infections à l'entrée.

La limite du plateau technique pour le typage notamment la non disponibilité des primers de certains serotypes nous a empêcher de les identifier

Le devenir des enfants perdus de vue demeure inconnu .

2-Caractéristiques sociodémographiques des patients :

Notre étude , menée de janvier 2011 à juillet 2013 a porté sur 198 Souches de salmonella isolés de 11811 prélèvements d'hémoculture soit 1,68%.

Parmi ces 198 salmonella isolées des hémocultures 12 ont été retrouvé dans les LCR.

Ce taux est proche de celui de **KAMDEM.C [33]** chez qui il est de 2,06%

En 2010 **DIARRA.D [6]** dans une étude similaire dans le même service a trouvé une fréquence de 2,70%.

Le sexe masculin a été le plus retrouvé dans notre étude avec 63 % sexe ratio de 1,71.

Ce résultat comparable à celui de **KEITA .I [29]** qui a trouvé une prédominance masculine de 60,3% et est contraire à celle de **DIARRA D.** qui a trouvé une prédominance féminine de 51,6%.

TRAORE.M [34] a trouvé une prédominance masculine de 59% dans son étude en 2007.

Cette prédominance masculine pourrait s'expliquée par l'effectif élevée des garçons dans notre échantillon .

La majorité de nos patients étaient dans la tranche d'âge 12-48 mois soit 53%.

Ceci peut s'expliquer par l'immaturation du système immunitaire, les mauvaises conditions d'hygiène et l'impossibilité pour les enfants de cet âge d'observer les mesures d'hygiène.

Même résultat chez **KAMDEM C.[33]** qui a trouvé 47% dans la même tranche d'âge en 2003.

La tranche d'âge 12 à 48 mois a été majoritaire avec 54% dans l'étude de **TRAORE M[34]** et 81,1% des patients dans cette dernière étude avaient moins de 5 ans.

Notre étude vient à démontrer encore une fois que la salmonellose n'est plus seulement une maladie de l'adulte et des grands enfants mais aussi des petits enfants. ce qui était méconnu dans les données de la littérature selon lesquelles la salmonellose est une maladie de l'adulte et des grands enfants.

Le sevrage précoce des enfants, la diversification de leur alimentation, le faible niveau de sensibilisation et d'information des gardiennes des enfants sur les mesures d'hygiène accroît le risque d'infection à salmonella.

Aucune commune et région n'a été épargnée.

Les plus touchées ont été les résidents dans les régions avec 32% suivi de la commune IV avec 16%

TRAORE M [34] avait trouvé en commune IV 21,6% et 18,9% pour la commune I.

La fréquence d'isolement des salmonelles dans hémocultures a été de 1,68%, ce résultat est inférieur à celui de Mallé D [23] qui a trouvé une fréquence de 4,68 %.

La fréquence d'isolement des salmonelles dans les LCR a été de 0,17 % contre 0,43 % retrouvés chez Mallé D[23].

Parmi les 198 souches de salmonelles isolés dans notre étude, le serogroupe le plus fréquent était le serogroupe D (77%) suivi du serogroupe

B (12%) , salmonella spp(8 %) C et E ou G avec respectivement (1,5%) et A (0,5%).

[Lee JY](#) et [al\[27\]](#) ont trouvé dans leur étude , le groupe D comme le plus fréquent avec (39,5 %), suivie de B (32,4 %), C (22,7 %), E (2,7 %), A (2,3 %) , et G (0,4%) .

Les trois serotypes les plus fréquents dans notre étude étaient salmonella Enteritidis (65,15%) suivi de salmonella Typhimurium (10,61%) et salmonella Dublin (10,61%). 12 souches soit 6,06% de salmonella Typhi , 4 souches de salmonella paratyphi B et une souche de salmonella paratyphi A ont également été détecté .

Au Sénégal , une étude réalisé par le CRSE a trouvé comme serotypes les plus courant Enteritidis (19 % des isolats) , Typhi (8 %) , Typhimurium (7 %) et le Kentucky (4 %).[30]

[Lee JY](#) et [al \[27\]](#) ont trouvé en Corée salmonella Enteritidis comme le serotype le plus fréquent avec 36,3%, suivi de Typhimurium (16,8%).

En 2008, 3944 souches de *Salmonella* humaines ont été répertoriées par le CNRSS en Belgique, Enteritidis a été le deuxième sérovar le plus fréquent (21% des souches de Salmonelle), le premier étant Typhimurium (57,7% des souches). [31]

En 2011, le Centre national de référence des *Salmonella* (CNRS) de l'Institut Pasteur, à Paris, avait référencé 11069 souches de *Salmonella* d'origine humaine. Les serotypes Enteritidis et Typhimurium en représentaient respectivement 16,34 % et 32,5 %.[32]

Du point de vu de concordances, les résultats de nos deux techniques ont été concordants à 100% dans l'identification de salmonella paratyphi A, à 92% dans celui de salmonella paratyphi B, à 90% dans celui du groupe D et 85,7% dans celui de salmonella Typhi.

Ce résultat est légèrement inférieur à celui de Mallé D [23] qui a eu 100% de concordance dans l'identification de salmonella Typhi.

Le typage par la technique de PCR écarte l'existence de salmonella paratyphi C et de salmonella E ou G parmi les souches identifiés comme telle par la technique de séroagglutination.

D'autres parts la technique de séroagglutination ne nous aurait pas permis d'isoler certaines *Salmonella* comme **Salmonella Typhimurium, Salmonella Dublin, Salmonella Enteritidis.**

Actuellement , les études internationales mettent l'accent sur l'augmentation rapide des salmonelles multi résistantes aux antibiotiques notamment par la dissémination du phage 104 en France[24] .

C' est pourquoi une grande vigilance dans l'utilisation des antibiotiques est nécessaire [26]

Dans notre étude, 5 antibiotiques ont été testé :

La ciprofloxacine a été sensible sur 193 des 198 souches de salmonelles isolées soit 97,5% de sensibilité. Ce résultat est similaire à celui d'**Ince OT et al [28]** qui ont trouvé 99,7% de sensibilité à la ciprofloxacine.

96% des souches de salmonelles étaient sensibles au ceftriaxone. Un résultat similaire à celui d'**Ince OT et al [28]** qui ont trouvé 95,3% de souches sensibles au ceftriaxone.

La sensibilité des antibiotiques utilisés durant notre étude sur les salmonelles est conforme aux données de la littérature

En revanche les résistances sont notées à l'ampicilline (82,3%), au chloramphénicol (73,26%) et au cotrimoxazole (43,4%).

Dans notre série, nous avons constaté 19% de décès (soit 38 malades) .

Ce taux est légèrement supérieur à celui retrouvé par **DIARRA .D[6]18.8%** et inférieur de **TRAORE. M [34]** avec 22% de décès .

Dans les pays développés le regain d'importance de salmonelloses mineurs contraste avec la diminution régulières des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes

Dans les pays en développement comme le Mali où les mesures d'hygiènes sont précaires, les salmonelles sévissent toujours sous forme endémo-épidémique

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6-CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :

6.1. CONCLUSION :

Nous avons effectué le typage de 198 souches de salmonella isolées chez les enfants de 0 à 16 ans souffrant d'une suspicion d'infection bactérienne invasive dans le service de pédiatrie du CHU-GT.

Le sexe masculin a été le plus prédominant avec 63% et un sexe ratio de 1,71

La tranche d'âge 12-48 mois a été la plus représentée avec 53%

La majorité des patients provenaient des régions du Mali

Le serogroupe D a été le plus fréquent avec (77%), suivi du B (12%)

Le serotype Enteritidis a été le plus isolé (65,15%) suivi de typhimurium et Dublin avec 10,61% chacun.

Les techniques de seroagglutination Wellcolexcolour et de PCR ont été concordant à 100% dans l'identification de salmonella paratyphi A, à 92% dans celui de salmonella Paratyphi B, et 85,7% dans celui de Typhi .

Le typage par la technique de PCR écarte l'existence de salmonella Paratyphi C et de salmonella E ou G parmi les souches identifiés comme telle par la technique de séroagglutination.

D'autres parts la technique de séroagglutination ne nous aurait pas permis d'isoler certaines *Salmonella* comme *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Enteritidis*

97,5% des souches de salmonelles étaient sensible au ciprofloxacine, 96% au ceftriaxone en revanche les résistances sont notées à l'ampicilline (82,3%), au chloramphénicol (73,26%) et au cotrimoxazole (43,4%).

Nous avons observés 66% d'amélioration et 19% de décès.

La technique de séroagglutination reste certes une technique rapide et disponible pour faire le typage des souches de salmonella mais les résultats obtenus doivent être confirmés par les techniques de biologies moléculaires notamment la PCR .

6.2. RECOMMANDATIONS :

Au terme de cette étude nous formulons les recommandations suivantes :

Au ministère de la sante :

- 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.
- L'introduction dans le programme élargie de vaccination PEV d'un vaccin contre les salmonelles.
- La promotion des projets de recherche médicale type CVD-MALI.
- Rendre possible la pratique des hémocultures dans les structures sanitaires en les équipant avec des automates .
- Vulgariser les outils de diagnostic comme les techniques de séroagglutination et des biologies moléculaires dans les structures sanitaires .

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.

Aux prescripteurs :

- Demander une hémoculture ou une coproculture devant toute suspicion d'infection à salmonelles
- Réviser régulièrement les protocoles thérapeutiques selon les résultats de recherche

A la population :

- Renforcer les mesures hygiéno-diététiques.
- Venir à l'hôpital immédiatement devant toute fièvre chez les enfants

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1-NASRELDIN E, REEM A, AND MOHAMMED A. Prevalence of non typhoidal Salmonella serogroups and their antimicrobial resistance patterns in a university teaching hospital in Eastern Province of Saudi Arabia. Infect Drug Resist. 2013; 6: 199–205.

2- MATTHEW L , RANIERI , CHUNLEISHI, et al .Comparison of Typing Methods with a New Procedure Based on Sequence Characterization for Salmonella Serovar Prediction . J Clin Microbiol. 2013 June ; 51(6): 1786–1797.

3- DESBOUCHAGES L, PANGON B, DOUCET-POPULAIRE F, et al. Diarrhées infectieuses à salmonelles. Feuillet Biol 2004 ; 45/259 : 7-19.

4- PENNEC YL, GARRE M. Salmonelloses de l'adulte.EMC – Maladies Infectieuses 2003 ; 8-018-A-15, 9 p.

5-PIERRE A. Les salmonelloses actualités 2013. Médecine tropicale[en ligne] décembre 2013 [consulté le 27/12/2013] ; 1(1) : [6 pages].

6- DIARRA DRISSA

Salmonelloses chez les enfants de 0 à 15 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE du 1^{er} janvier au 31 décembre 2008 . Thèse méd. 2010, N°475

7- BERCHE P, GAILLARD JL, SIMONET M. Les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion ; 1988 : 77-92 et 572-592.

8- LE MINOR L.Les salmonelles. In : LE MINOR L Bacteriologie médicale Paris : Flammarion, 1992 ; 259-74

9-**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.

10-**CAQUET R.** Guide pratique des examens de laboratoire. 6e Editon, Paris 1994.

11-**AZELE F.** Bactériologie médicale. La Madeleine : C et D, 1982 ; 12 : 24.

12-- **BOUVET E HUBERT B.** Epidémiologie des salmonelloses mineures Rev.Prat., 1992 ; 42 : 275-8.

13-**CAVALLO JD, MEYRAN M.** Les Salmonelloses et leur pathologie : base bactériologique du traitement. Med. mal. Inf., 1992; 22 : 331.

14-- **MARCOU MEURISSE JJ.** Salmonelloses : aspects thérapeutiques. Med. Mal. Inf., 1992 ; 22 : 340.

15-**LE MINOR L, RICHARD C.** Institut Pasteur de Paris, Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries.

16-**ASTRUC J, RODIERE M.** Les salmonelloses en pédiatrie méd. Mal. Inf., 1986 ; 16 : 344-9.

17-**LE MINOR L, GRIMONT PAD.** Rapport quadriennal du Centre National des Salmonella sur l'origine et la répartition en serotypes des souches isolées en France continentale au cours des années 1980 a 1983. Rev. Epidemiol. et Sante Pub., 1985 ; 33 : 13- 21.

18-**BASTIN R, CHARMOT G, FROTTIER J, WILDE JL.** Maladies infectieuses et parasitaires. 2e éd. Paris : Flammarion, 1981. 66-73.

19-**OMS.** Lutte contre les salmonelles : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits. Série de rapports techniques. Genève: 1988; n°774.

20- **MICHAEL C. MILONE.** Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania MThe causative agent of typhoid fever is the bacterium *Salmonella Typhi*. (Image courtesy of the Centers for Disease Control and Prevention.)Medical Center, Philadelphia, PA.

21-**HILTON CS, HIGGINS CF et SHARP PM.** ~ ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichiacoli, Salmonella Typhimurium and other enterobacteria. Mol. Microbiol., 1991; 5: 825-34.

22-**BRISABOIS A, GOULLET Ph.** Isolation and characterization of carboxylesterase E3 from Salmonella enterica. In Interet et limites des techniques de caracterisation des Salmonella. Epidemiol. et sante anim., 2001 ; 39 : 31-42

23-**MALLE D.** Typage des souches de salmonella isolées au laboratoire de bactériologie du CVD du CHU GABRIEL TOURE de janvier 2005 à mai 2006 .Thèse pharm., Bamako, 2008, N°13

24- OMS, centre des média , aide mémoire n°139 révisé en avril 2005

25-**GUILLAUME P T.** La microbiologie. In 2004.

26- SANOU I, G.K .ZERBO ,I.BICOBA , R. OUEDRAOGO TRAORE , L. SANGARÉ . Méningite à salmonelles à propos de 11 cas colligés au centre hospitalier national Yalgado OUEDRAOGO de OUAGADOUGOU .article : 354000102010450040 ISS N : 399-077x, année 2002

27-LEE JY, KIM JA, JEONG HS, et al Serotyping and antimicrobial susceptibility of Salmonella spp.: nationwide multicenter study in Korea. Jpn infect Dis 2013; 66(4):284-9

28- INCE OT, YALCIN SS, YURDAKOK K, et al Salmonella gastroenteritis in children (clinical characteristics and antibiotic susceptibility): comparison of the years 1995-2001 and 2002-2008.Turk J Pediatr. 2012 Sep-Oct;54(5):465-73.

29- KEITA .I les salmonelloses chez les enfants de 0 à 35 mois traités en externe dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE de janvier à Décembre 2008 thèse med 2010 N° 476

30- HARROIS D, BREUREC S, SECK A, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical Salmonella enterica isolates in Dakar, Senegal, from 1999 to 2009.ClinMicrobiol Infect.2013 Jul 18. doi: 10.1111/1469-0691.12339

31- Centre National de Référence des Salmonella et Shigella(CNRSS).Rapport Annuel 2008 sur l'isolement des souches de Salmonella et Shigella. <http://www.iph.fgov.be/bacterio>. Consulté le 12/11/2013

32- WEILL F, LE HELLO S,centre national de référence des Salmonella. Rapport d'activités annuel 2011

33-KAMDEM.C.

Les salmonelloses dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE de février 2002 à février 2003 à propos de 138 cas. Thèse méd. 2003, N°10

34-TRAORE MOMINE.

Septicémies à salmonelles non Typhiques dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE à propos de 37 cas, thèse méd.2007, N°259

FICHE SIGNALÉTIQUE :

NOM : TRAORE PRENOM : Sounkarou

Email : traoresounkarou@yahoo.fr

Tel : 0022375216365

Titre : Typages des souches de salmonella isolées au laboratoire de bactériologie CVD du CHU GABRIEL TOURE de Janvier 2011 à Juillet 2013.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2012 – 2013

Résumé : Nous avons effectué le typage de 198 souches de salmonella isolées chez les enfants de 0 à 16 ans souffrant d'une suspicion d'infection bactérienne invasive dans le service de pédiatrie du CHU-GT.

Le serogroupe D a été le plus fréquent avec (77%), suivi du B (12%)

Le serotype Entéritidis a été le plus isolé (65,15%) suivi de salmonella Typhimurium et Dublin avec 10,61% chacun

La technique de séroagglutination reste certes une technique rapide et disponible pour faire le typage des souches de salmonella mais les résultats obtenus doivent être confirmés par les techniques de biologies moléculaires notamment la PCR.

Mots clés : *Salmonella* , typage , enfant , PCR

Abstract:

We conducted typing 198 strains of Salmonella isolated from children 0-16 years of age with suspected invasive bacterial infection in the pediatric ward of the University Hospital-GT.

Serogroup D was the most common with (77%), followed by B (12%)

Serotype Enteritidis was the most isolated (65.15%) followed by Salmonella typhimurium and Dublin with 10.61% each

While the technique of agglutination remains a fast and available technique for typing strains of salmonella but the results must be confirmed by molecular techniques including PCR biologies.

Keywords: Salmonella, typing, child, PCR

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

JE LE JURE